

EFFET DE DIFFÉRENTS RATIOS D'OMÉGA-6/OMÉGA-3 ET DE
L'ENTÉROLACTONE SUR L'EXPRESSION DE GÈNES IMPLIQUÉS DANS
L'IMPLANTATION EMBRYONNAIRE ET SUR LA SÉCRÉTION DE
PROSTAGLANDINES DANS LES CELLULES ENDOMÉTRIALES CHEZ LA
VACHE LAITIÈRE

par

Catherine Hallé

Mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, janvier 2012



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-83748-1

Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-83748-1

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Le 20 janvier 2012

*le jury a accepté le mémoire de Madame Catherine Hallé
dans sa version finale.*

Membres du jury

**Professeur Richard Blouin
Directeur de recherche
Département de biologie**

**Madame Marie-France Palin
Codirectrice de recherche
Agriculture et Agroalimentaire Canada**

**Professeur Viktor Steimle
Membre
Département de biologie**

**Professeur François Malouin
Président rapporteur
Département de biologie**

RÉSUMÉ

Présentement, l'industrie laitière est aux prises avec des problèmes de reproduction chez les vaches, dont la mortalité embryonnaire est l'un des plus importants. Le plus souvent, la perte de l'embryon survient durant la période de péri-implantation, car celui-ci ne parvient pas à inhiber suffisamment la sécrétion de prostaglandine $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) par les cellules épithéliales de l'utérus. Plusieurs études ont démontré que la survie embryonnaire chez la vache laitière peut être améliorée par un supplément alimentaire en graines de lin, lesquelles sont riches en acide alpha-linolénique (ALA), un oméga-3, et en lignanes. De plus, notre équipe de recherche a observé que le niveau de sécrétion des prostaglandines, ainsi que le niveau d'expression de plusieurs gènes utérins impliqués dans la survie embryonnaire (jour 17), sont modulés par un supplément alimentaire de graines de lin durant la période de péri-implantation embryonnaire. Il a été démontré que la graine de lin peut diminuer le ratio sanguin d'acides gras oméga-6/oméga-3 et qu'elle augmente la concentration circulante d'entérolactone (ENL), un métabolite de lignane qui agit comme phyto-oestrogène et comme antioxydant. Cependant, ces études *in vivo* ne permettent pas de distinguer si les effets de la graine de lin sur l'utérus sont dus aux acides gras, à l'ENL ou aux deux, ni de distinguer comment les différents types cellulaires de l'endomètre répondent à ces traitements.

L'objectif de ce projet de recherche était de déterminer quels sont les effets directs de différents ratios oméga-6/oméga-3 et de l'ENL sur l'expression de différents gènes sélectionnés et sur la sécrétion de prostaglandines dans un modèle *in vitro* de culture cellulaire endométriales primaires. Tout d'abord, 16 gènes ont été sélectionnés parmi ceux étant différentiellement exprimés dans l'utérus de vaches au jour 17 de la gestation, lesquelles avaient reçu ou non un supplément alimentaire de 10% graines de lin. Ces 16 gènes sont impliqués ou sont suspectés de jouer un rôle dans la survie embryonnaire et/ou la synthèse des prostaglandines. Tout d'abord, afin de mieux connaître le profil d'expression de ces gènes dans l'endomètre, la variation du niveau d'expression de ces

gènes au cours du cycle oestral a été caractérisée *in vivo* par PCR quantitatif en temps réel (RT-qPCR). Par la suite, deux types cellulaires ont été isolés à partir d'utérus de vache; les cellules stromales et les cellules épithéliales. Ces cellules ont été traitées avec de la progestérone et de l'interféron-tau, de manière à mimer la présence d'un embryon en début de gestation. Ces cellules utérines ont été traitées avec 6 différents ratios d'acides gras oméga-6/oméga-3 (acide linoléique / acide alpha-linolénique), avec de l'ENL ou avec ces deux traitements (acides gras + ENL). Suite à ces traitements, les niveaux d'ARN messagers des 16 gènes sélectionnés ont été mesurés par RT-qPCR. La concentration de $\text{PGF}_{2\alpha}$, de prostaglandine E 2 (PGE_2) et le ratio $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ ont été mesurés par « enzyme immuno assay (EIA) ».

Les résultats obtenus démontrent que la variation du ratio oméga-6/oméga-3 et/ou que l'ENL peuvent moduler l'abondance relative d'ARN messenger de plusieurs gènes, mais de manière différente dépendamment du type cellulaire étudié. De plus, une diminution du ratio oméga-6/oméga-3 entraîne une diminution de la production de prostaglandines et une augmentation du ratio $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ par les cellules épithéliales. La présence d'ENL dans le milieu de culture a permis de diminuer la sécrétion des prostaglandines étudiées de manière dose-dépendante dans les cellules stromales et épithéliales. De plus, nos résultats démontrent une interaction entre l'ENL et la présence d'acides gras au niveau de la réduction des sécrétions de prostaglandines. Pour les cellules stromales, nous observons une association entre la diminution de sécrétion des prostaglandines par l'ENL et la diminution de l'abondance d'ARN messagers de la prostaglandin E synthase (*PTGES*) et de l'Aldo-keto reductase family 1, member B1 (*AKR1B1*), deux gènes impliqués dans la synthèse des prostaglandines. Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude démontrent que la variation des ratios d'oméga-6/oméga-3, ainsi que l'ENL agissent directement sur l'expression de certains gènes et sur la sécrétion des prostaglandines dans les cellules stromales et épithéliales de l'endomètre bovin. Cependant, les réponses cellulaires obtenues diffèrent en fonction du type cellulaire étudié.

Mots clés : prostaglandines, entérolactone, acides gras, endomètre, vache laitière.

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier sincèrement Dre. Marie-France Palin, ma directrice de projet à Agriculture et Agroalimentaire Canada, pour sa grande disponibilité, sa confiance, sa grande qualité de chercheuse, son soutien et ses encouragements. Merci également au Dr. Richard Blouin, mon co-directeur à l'Université de Sherbrooke pour ses conseils et son support. Merci aux membres de mon comité de maîtrise, Dr. Viktor Steimle et Dr. François Malouin, pour leur accompagnement durant mon cheminement et leurs judicieux conseils. Merci au Dr. Alan Goff et au Dre. Hélène Petit pour avoir contribué à ce projet de recherche en y apportant leur expertise, leurs conseils et leurs idées. J'aimerais remercier spécialement Monsieur Steve Méthot pour toutes les analyses statistiques, pour sa grande compétence et tout le temps qu'il a investi à analyser de manière scientifique, objective et représentative les nombreux résultats générés lors de mon projet de recherche.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame Danièle Beaudry pour son expertise technique inestimable, son temps, ses excellents conseils et sa contribution technique au projet de recherche. Merci également à mesdames Marian Mayhue et Karine L'Ériger pour leur contribution technique. Merci également au personnel de l'entreprise Viandes Giroux Inc. pour l'accueil, la compréhension et les accommodements lors de mes prélèvements d'échantillons.

Merci à ma famille; ma mère, mon père et mon frère, qui m'ont encouragée à poursuivre les études de mon choix et à persévérer. Je remercie également les membres de ma famille pour avoir toujours valorisé le travail et l'effort intellectuel. Finalement, j'aimerais remercier le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) pour la bourse d'étude qui m'a été accordé, ainsi qu'Agriculture et Agroalimentaire Canada pour le financement du projet de recherche.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	3
REMERCIEMENTS	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS	7
LISTE DES TABLEAUX.....	9
LISTE DES FIGURES	10
INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE	11
A. Importance économique de l'industrie laitière au Canada.....	11
B. Problèmes de fertilité chez les vaches laitières.....	11
a. Amélioration de la production laitière au dépend de la fertilité.....	12
b. Comment améliorer la fertilité	13
C. La reproduction chez la vache laitière.....	14
a. Cycle oestral.....	14
b. Particularités anatomiques de l'utérus chez la vache.....	19
c. Gènes utérins modulés durant le cycle oestral	20
D. Début de la gestation	20
a. Anatomie de l'embryon avant l'attachement à l'utérus.....	20
b. Attachement du blastocyste.....	22
c. Gènes utérins impliqués dans l'implantation	23
d. Rôle de la PGF _{2α} et de la PGE ₂ dans la reproduction chez la vache	24
E. Les acides gras polyinsaturés.....	25
a. Structure des différents acides gras polyinsaturés.....	25
b. Dérivés des acides gras polyinsaturés.....	27
F. Synthèse des prostaglandines.....	29
a. Source alimentaire des acides gras polyinsaturés chez la vache.....	32
G. La graine de lin	33
a. Importance économique de la graine de lin.....	33
b. Composition nutritive de la graine de lin.....	33
H. Effets des acides gras n-3 et n-6 sur la reproduction des vaches laitières ...	34
a. Effets <i>in vivo</i> des acides gras polyinsaturés	35
b. Effets <i>in vitro</i> des acides gras polyinsaturés.....	37
I. Effets de l'entérolactone sur la reproduction.....	37
J. Le projet de recherche.....	38
a. Hypothèses et objectifs.....	39
b. Approche méthodologique	40
CHAPITRE 1	43
ARTICLE SCIENTIFIQUE	43
1.1 Avant-propos	43
1.2 Impact de cet article.....	44
1.3 Article scientifique	47
CHAPITRE 2	94
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	94
BIBLIOGRAPHIE.....	100

LISTE DES ABRÉVIATIONS

μM : Micromole/litre
AA : Acide arachidonique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
AG: Acides gras
AKR1B1: Aldo-keto reductase family 1, member B1
ALA : Acide alpha-linolénique
ANXA2: Annexin A2
ARNm: acide ribonucléique messenger
ATP : Adénosine triphosphate
BEND (cellules) : lignée de cellules immortalisées épithéliales endométriales bovines
C : Carbone
C-C : Carbone-carbone
 CH_3 : Groupement méthyle
CTGF: Connective tissue growth factor
COPI : Traitement contrôle (contient de la progestérone et de l'interféron-tau)
CXCL10: Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
CYP39A1: Cytochrome P450, family 39, subfamily A, polypeptide 1
DHA: Acide docosahexaénoïque
DKK1: Dickkopf homolog 1
EETs : acides époxyeicosatriénoïques
EC: Cellules épithéliales endométriales bovines en culture primaire
EIA: Enzyme immuno assay
ENL: entérolactone
EPA : Acide éicosapentaénoïque
FA0 : Traitement sur les cellules en culture avec l'acide gras ALA (ratio LA/ALA de 0)
FA1 : Traitement sur les cellules en culture avec des acides gras au ratio LA/ALA de 1
FA4 : Traitement sur les cellules en culture avec des acides gras au ratio LA/ALA de 4
FA15 : Traitement sur les cellules en culture avec des acides gras au ratio LA/ALA de 15
FA25 : Traitement sur les cellules en culture avec des acides gras au ratio LA/ALA de 25
 $\text{FA}\infty$: Traitement sur les cellules en culture avec l'acide gras LA (ratio LA/ALA ∞)
FOS: FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
FSH : Hormone folliculo-stimulante
GJA1: Gap junction protein, alpha 1, 43kDa
HETEs : acides hydroxyeicosatétraénoïques
IFIT3: Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
 $\text{IFN-}\tau$: Interféron-tau
IRF1: Interferon regulatory factors 1
IRF2: Interferon regulatory factors 2
IRF6: Interferon regulatory factor 6
ISG15: ISG15 ubiquitin-like modifier
LA : Acide linoléique
LH : Hormone lutéinisante

n-3 : Oméga-3
 n-6 : Oméga-6
 NFκB: Nuclear factor kappa B
 OAS1: 2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa
 OAS2: 2',5'-oligoadenylate synthetase 2
 PARM1: Prostate androgen-regulated mucin-like protein 1
 P₄: Progestérone
 PG: Prostaglandines
 PGE: Prostaglandines E
 PGE₂: Prostaglandine E 2
 PGE₃ : Prostaglandine E 3 (PGF_{3α})
 PGEM : Prostaglandin E metabolite
 PGES: Prostaglandines E synthases
 PGF: Prostaglandines F
 PGF_{2α} : Prostaglandine F 2 alpha
 PGF_{3α}: Prostaglandine F 3 alpha
 PGFM : 13,14-dihydro-15-keto-PGF_{2α} (Prostaglandin F_{2α} metabolite)
 PGFS: Prostaglandines F synthases
 PGH₂ : Prostaglandines H 2
 PGH₃ : Prostaglandines H 3
 PLA₂: Phospholipase A 2
 PPARα : Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
 PTGES: Prostaglandin E synthase
 PTGS: prostaglandin-endoperoxide synthase
 PTGS1: Prostaglandin-endoperoxide synthase 1
 PTGS2: Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
 RT-qPCR : PCR quantitatif en temps réel
 SC: Cellules stromales endométriales bovines en culture primaire
 SDG: Secoisolariciresinol diglucoside
 STC1: Stanniocalcin 1
 TGFB1 : Transforming growth factor, beta 1
 ZFP36L1 : Zinc finger protein 36, C3H type-like 1

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
1	Gènes sélectionnés parmi ceux différentiellement exprimés dans l'endomètre de vaches laitières ayant reçu un supplément de 10% de graines de lin.	42
A1*	Description of experimental treatments used on primary bovine endometrial cell cultures.	57
A2*	Primer sequences used for quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analyses.	61
A3*	Effects of enterolactone combined or not with fatty acids LA/ALA ratio 4:1 on expression of selected genes in endometrial stromal and epithelial cells.	72
A4*	Effects of enterolactone combined or not with fatty acids LA/ALA ratio 4:1 on PGE ₂ and PGF _{2α} secretion from endometrial stromal and epithelial cells.	77

*Le A qui précède le numéro du tableau signifie que ce dernier se trouve dans l'article scientifique.

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1	Variations des concentrations d'hormones gonadotropiques et ovariennes retrouvées dans le plasma durant le cycle oestral chez la vache.	15
2	Morphologie des ovaires à différents stades du cycle oestral chez la vache.	18
3	Structures du blastocyste de la vache laitière au septième jour de gestation.	21
4	Structure des principaux acides gras polyinsaturés.	26
5	Conversion des acides gras polyinsaturés et de leurs différents dérivés.	28
6	Synthèse des prostaglandines.	30
A1*	Relative mRNA abundance of selected genes in dairy cows endometrium throughout the estrous cycle.	65
A2*	Relative mRNA abundance of selected genes in primary endometrial cell cultures treated with progesterone and roIFN- τ .	67
A3*	Relative mRNA abundance of selected genes in primary endometrial cell cultures treated with different fatty acid ratios (LA/ALA).	69
A4*	Effects of the different fatty acids ratios on stromal and epithelial endometrial cells PGE ₂ and PGF _{2α} secretions.	74
A5*	Effects of the different fatty acid ratios (LA/ALA) treatments on stromal and epithelial endometrial cells PGE ₂ and PGF _{2α} secretions.	76

*Le A qui précède le numéro de la figure signifie que cette dernière se trouve dans l'article scientifique.

INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE

A. Importance économique de l'industrie laitière au Canada

Dans le secteur agricole, l'industrie laitière se classe au troisième rang en termes d'importance économique au Canada. En 2008, les profits générés par cette industrie totalisaient 13,1 milliards de dollars en ventes et 5,3 milliards de dollars en profit net sur les fermes. Actuellement, la population canadienne de vaches laitières est estimée à un peu moins d'un million d'individus et 93% de ces vaches laitières sont de race Holstein (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2009). L'amélioration de la production laitière ou encore la résolution de problèmes reliés à l'industrie laitière, au Canada comme ailleurs, ont donc un impact économique non négligeable.

B. Problèmes de fertilité chez les vaches laitières

Depuis quelques années, il a été observé qu'environ 30% des vaches canadiennes réformées le sont à cause de problèmes de fertilité. Les problèmes de fertilité constituent ainsi la première cause de réforme des vaches laitières au Canada (Agriculture et Agroalimentaire Canada *et al.*, 2008a). On estime que le taux de fertilité était en baisse de 1% par année (Lamming *et al.*, 1998) jusqu'en 2004-2005, où la situation semble s'être stabilisée grâce à des programmes de sélection et d'amélioration génétique, ainsi qu'à d'autres facteurs jouant un rôle sur le taux de conception, comme la nutrition et la détection des chaleurs. (Doormaal, 2010). Aux États-Unis, dans les années 1950, le taux de conception était en moyenne de 55% et de 65% pour les premières saillies. Dans les années 1990, les taux de conceptions variaient entre 35% et 45% (Lucy, 2001). Une baisse de fertilité similaire a également été observée un peu partout dans le monde chez les vaches Holstein (Lucy, 2007). Les échecs de fertilité peuvent être attribués à

différents facteurs, comme des problèmes d'ovulation, une irrégularité du cycle œstral, des problèmes survenant au moment de la péri-implantation ou une incompétence utérine ou placentaire conduisant à la mortalité embryonnaire (Lucy, 2007). Une très grande proportion des échecs de reproduction semblent toutefois être dus à une mortalité embryonnaire en début de gestation (Peters et Ball, 1987). Les causes de la mortalité embryonnaire pourraient être reliées à un problème au niveau utérin, embryonnaire ou les deux, empêchant ainsi la reconnaissance materno-fœtale et l'implantation de l'embryon.

a. Amélioration de la production laitière au dépend de la fertilité

Dans les dernières décennies, la production annuelle de lait par vache laitière Holstein a considérablement augmentée, principalement grâce à la sélection génétique, au mode de production plus intensif et à la modification de l'alimentation des vaches. (Agriculture et Agroalimentaire Canada *et al.*, 2008b; Lucy, 2001). Par contre, l'amélioration du rendement en production laitière est corrélée avec la diminution de la fertilité chez les femelles Holstein et pourrait être la cause de ce déclin (Doormaal, 2010).

Afin de maintenir une bonne productivité tout au long de leur période reproductive, les vaches laitières doivent absolument préserver une bonne fertilité, car sans vêlage il n'y a pas de lactation. De plus, les problèmes de fertilité entraînent directement des inconvénients coûteux pour les producteurs. En effet, plus il y aura de retours en chaleur, plus d'inséminations seront nécessaires, entraînant des délais avant le premier vêlage ou entre les vêlages subséquents. Aussi, cette situation augmente le nombre de vaches qui seront réformées. Tout cela entraîne des pertes économiques considérables pour l'industrie laitière. Il est donc nécessaire et urgent de trouver des solutions pour préserver et améliorer la fertilité chez les vaches laitières.

b. Comment améliorer la fertilité

Puisque la fertilité des vaches est absolument primordiale à la rentabilité de l'industrie laitière, il faut trouver des solutions pour remédier à la situation actuelle. Cependant, les caractères reproducteurs sont faiblement héréditaires, sont limités au sexe et ne peuvent pas être mesurés avant la maturité sexuelle. De plus, il est accepté que les traits reproducteurs les plus importants au niveau économique sont polygéniques (Palin *et al.*, 2009). Ces facteurs font en sorte que les progrès en matière de sélection génétique pour améliorer la fertilité chez la vache laitière ont été limités ces dernières années. Bien qu'il y ait plusieurs recherches prometteuses en sélection génétique visant à améliorer les caractères de reproduction, les effets réels pour l'industrie laitière seront ressentis seulement à long terme. Il devient donc important de chercher des alternatives qui permettraient d'améliorer la fertilité de la vache laitière à court terme (Lucy, 2007). Dans cette optique, une approche en nutriginomique pourrait s'avérer efficace pour améliorer la fertilité des vaches laitières. La nutriginomique est un domaine en expansion qui permet de moduler l'expression de certains gènes, et par conséquent les fonctions cellulaires, grâce à des composés que l'on retrouve dans les aliments. Par conséquent, il serait donc intéressant d'optimiser la diète des vaches laitières de manière à moduler l'expression de gènes étant associés à une meilleure fertilité. De plus, l'approche nutritionnelle pour améliorer la fertilité serait très accessible aux producteurs laitiers, qui sont déjà habitués à modifier l'alimentation de leurs animaux afin d'atteindre leurs objectifs de production laitière (Lucy, 2007).

C. La reproduction chez la vache laitière

a. Cycle oestral

Le cycle oestral chez la vache dure en moyenne 21 jours. Les cycles ovariens de la vache se succèdent tout au long de l'année et sont interrompus dans le cas d'une gestation. Les deux ovaires de la vache fonctionnent en alternance et à chaque cycle, un seul des deux ovaires libère normalement un ovule, parfois deux. Le cycle oestral est régulé par les hormones gonadotropiques de l'hypophyse, c'est-à-dire l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH), par l'ocytocine et par les hormones ovariennes, soit la progestérone (P_4) et les œstrogènes (principalement l'oestradiol) (voir figure 1) (Salisbury *et al.*, 1978).

Il y a différentes façons de diviser le cycle oestral, dépendamment du critère de référence utilisé. Dans la représentation classique commune à l'ensemble des mammifères, le cycle oestral comporte 4 phases : l'oestrus, le metoestrus, le dioestrus et le pro-œstrus. Il peut également être divisé en seulement deux phases, basées sur la fonction ovarienne : la phase folliculaire et la phase lutéale (Peters et Ball, 1987). Finalement, une troisième façon de diviser le cycle oestral se base sur l'apparence macroscopique des ovaires (Ireland *et al.*, 1980).

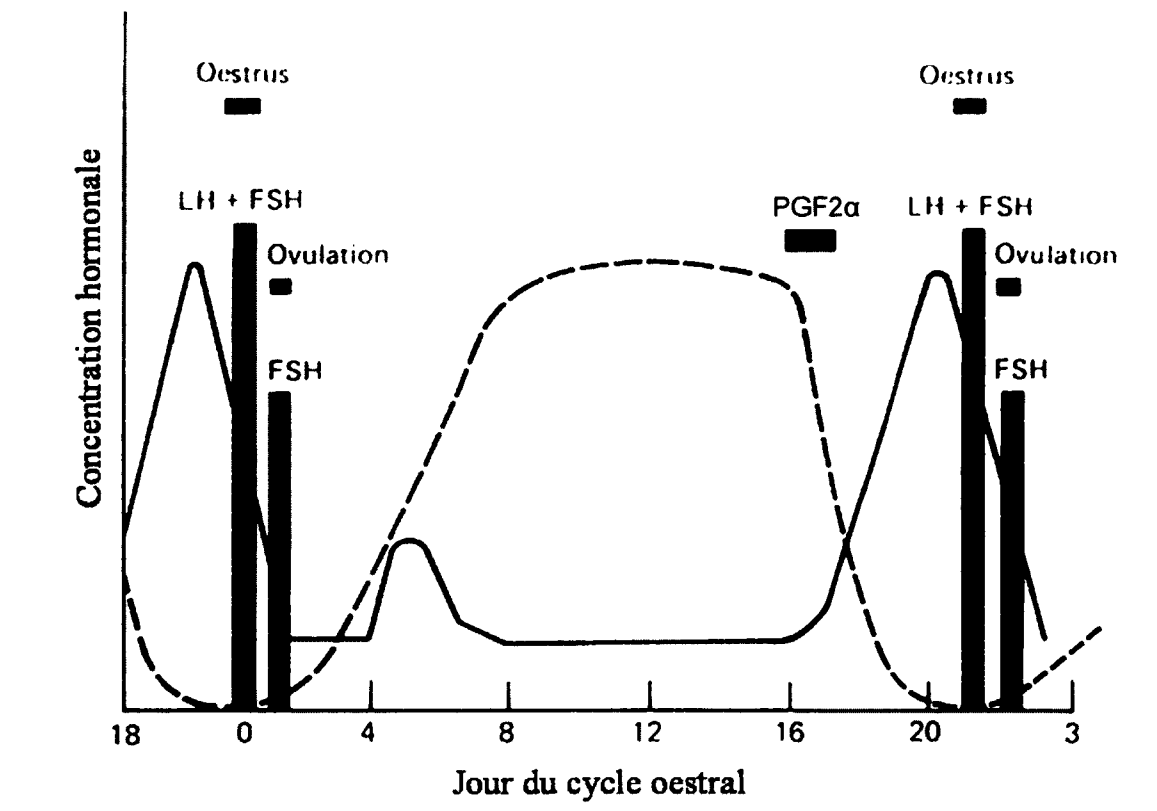


Figure 1: Variations des concentrations d'hormones gonadotropiques et ovariennes retrouvées dans le plasma durant le cycle oestral chez la vache.

L'ovulation (oestrus) marque le début du cycle oestral et elle est induite par un pic d'œstradiol et d'hormone luthéinisante (LH) qui précèdent le commencement du cycle (pro-oestrus). L'hormone folliculo-stimulante (FSH) quant à elle initie la maturation des follicules en vue du cycle suivant. Juste après l'ovulation, des jours 1 à 4, le niveau de progestérone est bas le temps que le corps jaune se forme sur l'ovaire (metoestrus). Dès que le corps jaune est formé, la sécrétion de progestérone augmente et reste élevée jusqu'au jour 17 (dioestrus). Aux jours 16-17 du cycle, la prostaglandine F 2 alpha ($\text{PGF}_{2\alpha}$) sécrétée par l'endomètre de l'utérus entraîne la dégénérescence du corps jaune, ce qui fait chuter le niveau de progestérone et mène au commencement d'un nouveau cycle oestral sur l'autre ovaire (pro-oestrus). _____ Oestradiol, - - - - - Progestérone, LH: Hormone lutéinisante, FSH: Hormone folliculo-stimulante, $\text{PGF}_{2\alpha}$: Prostaglandine F 2 alpha

Adapté de Peters et Ball (1987).

Le 1^{er} jour du cycle correspond au moment de l'ovulation, appelé oestrus (figure 1). À ce moment, le niveau de P₄ est faible et le niveau d'œstrogènes élevé (Mitko *et al.*, 2008). L'ovule est alors libéré du follicule mature et se retrouve à l'extérieur de l'ovaire (ovaire ipsilatéral), il sera alors acheminé à l'utérus via l'oviducte.

La période post-ovulation qui suit s'appelle le metoestrus et dure seulement quelques jours (jours 1-4) (Peters et Ball, 1987). À ce stade, le follicule deviendra le corpus hemorrhagicum, appelé ainsi car il est gorgé de sang. Sur l'autre ovaire (ovaire contralatéral), on peut alors distinguer le corps jaune presque complètement dégénéré qui s'était formé lors du cycle précédent (Arosh *et al.*, 2002). Durant le metoestrus, les niveaux de progestérone et d'oestradiol dans le sang sont faibles, même si l'ovaire sécrète déjà de la progestérone (Mitko *et al.*, 2008).

Le dioestrus se déroule des jours 5 à 17. Durant cette période, le corpus hemorrhagicum se transforme pour devenir le corps jaune (corpus luteum), lequel sécrète de la progestérone dans le sang (Peters et Ball, 1987). La progestérone joue plusieurs rôles essentiels à l'établissement de la gestation et il est démontré que des niveaux faibles de progestérone nuisent au succès reproducteur (Spencer *et al.*, 2007). Premièrement, la progestérone a pour fonction d'inhiber la maturation des follicules ovariens, ce qui empêche une nouvelle ovulation et évite le commencement du cycle suivant (Pru *et al.*, 2001). Cette hormone prépare également l'utérus à l'implantation de l'embryon en régulant l'activité et la croissance des cellules et des glandes utérines (Spencer *et al.*, 2007; Xiao et Goff, 1998). Lorsqu'il y a fécondation, la progestérone facilite la survie et la croissance du blastocyste (embryon, dès le 7^{ème} jour de gestation), le processus d'adhésion du blastocyste à l'endomètre, l'implantation embryonnaire, la placentation et l'embryogénèse, assurant ainsi le maintien de la gestation (Pru *et al.*, 2001; Spencer *et al.*, 2007). Durant le dioestrus, le niveau de progestérone dans le sang est élevé, alors que le niveau d'oestradiol est plutôt bas (Mitko *et al.*, 2008). Les phases metoestrus et dioestrus combinées portent également le nom de phase lutéale lorsque le cycle est divisé

selon la fonction ovarienne (Peters et Ball, 1987). La phase lutéale correspond donc à la formation et à la croissance du corps jaune.

En absence de fécondation, le cycle oestral se poursuivra jusqu'au pro-œstrus. À ce stade, l'ocytocine sécrétée par la neurohypophyse induit la sécrétion utérine de la prostaglandine $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). La $PGF_{2\alpha}$ ainsi sécrétée par l'utérus entraîne la régression, puis la disparition du corps jaune (Xiao *et al.*, 1999). Dès le début du pro-œstrus, le corps jaune commencera alors à dégénérer et le niveau circulant de progestérone chutera. La régression du corps jaune se nomme lutéolyse. La $PGF_{2\alpha}$ est donc un agent dit lutéolytique. Cette dernière phase du cycle oestral correspond aux jours 18-21 du cycle, durant lesquels la prochaine ovulation est en préparation sur l'ovaire contralatéral. Dès le début du pro-œstrus, le niveau d'oestradiol dans le sang augmente, puis vers la fin de ce stade, le niveau d'oestradiol commence à chuter. Lorsque que le taux d'oestradiol commence à chuter, on observe une augmentation marquée de la sécrétion de LH. La LH déclenchera alors une nouvelle ovulation, marquant ainsi le début du cycle suivant (Mitko *et al.*, 2008). Les phases pro-œstrus et œstrus combinées correspondent à la phase folliculaire, c'est-à-dire la phase ovarienne de la maturation du follicule pré-ovulatoire et la libération de l'ovule qu'il contient. Il s'agit du moment où la vache est féconde et réceptive sexuellement. Durant la phase folliculaire, la FSH favorise la croissance et la maturation des follicules en vue de l'ovulation du cycle suivant et la LH enclenche l'ovulation et la formation du futur corps jaune. (Peters et Ball, 1987).

Lorsqu'on divise le cycle oestral selon l'examen macroscopique des ovaires, on retrouve 4 stades distincts : stade 1 = jours 1 à 4, stade 2 = jours 5 à 10, stade 3 = jours 11 à 17 et stade 4 = jours 18 à 21 (voir figure 2). Le stade 1 correspond à l'œstrus et au metoœstrus, les stades 2 et 3 réfèrent au dioœstrus et le stade 4 correspond au pro-œstrus (Ireland *et al.*, 1980).

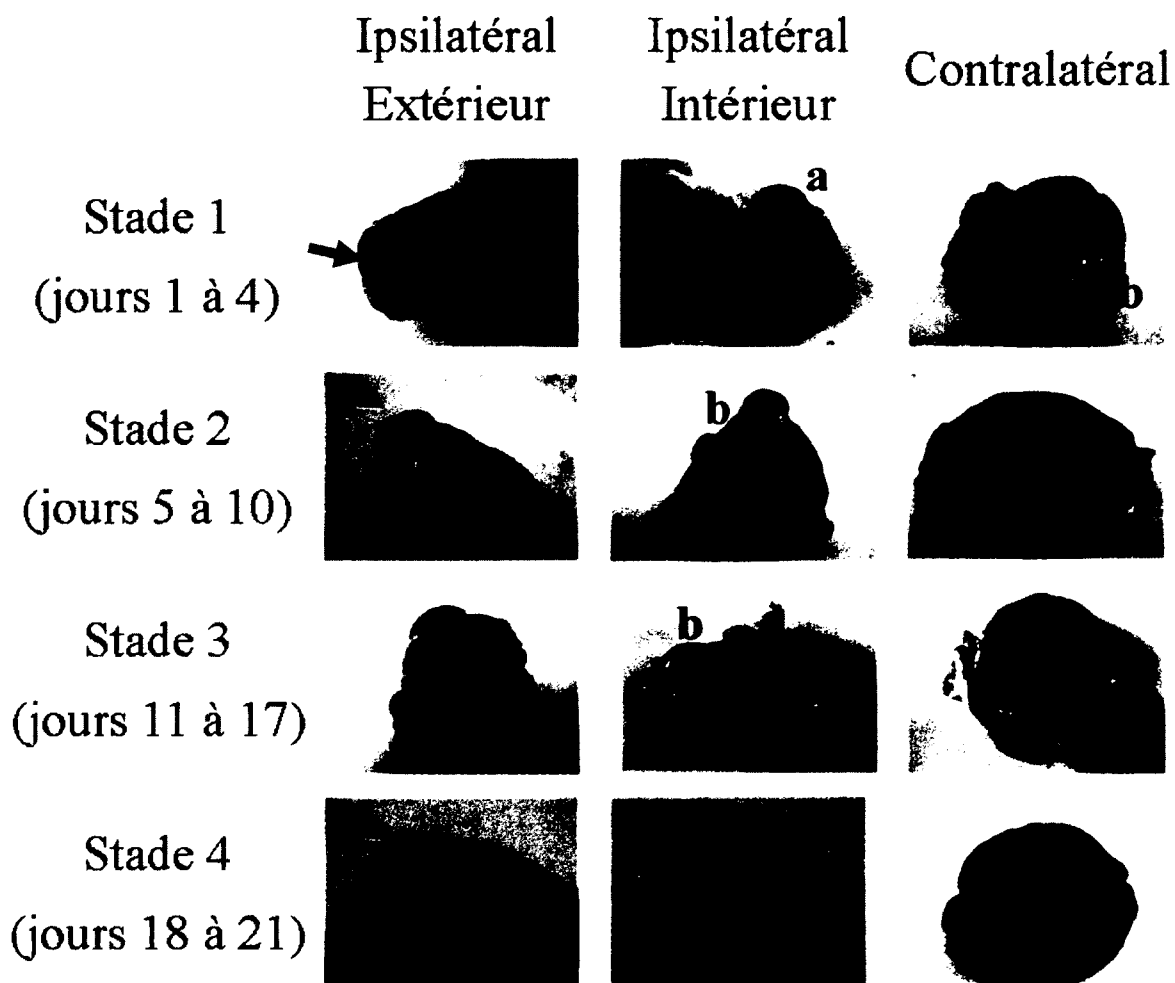


Figure 2: Morphologie des ovaires à différents stades du cycle oestral chez la vache.

L'ovaire ipsilatéral porte le corps jaune du cycle actuel. L'ovaire contralatéral correspond à celui qui portait le corps jaune au cycle précédent et le portera au cycle suivant.

➤ Point de rupture du follicule, **a** Corpus hemorrhagicum, **b** Corpus luteum (corps jaune). L'identification des stades a été faite en fonction de l'information publiée antérieurement (Arosh *et al.*, 2002; Ireland *et al.*, 1980).

b. Particularités anatomiques de l'utérus chez la vache

Chez la vache, l'utérus est en forme de «Y». Il se divise en fait en deux cornes utérines, chacune reliée à un des ovaires à son extrémité via l'oviducte. Le tissu qui recouvre la paroi interne de l'utérus s'appelle l'endomètre. Il s'agit d'une muqueuse qui est recouverte de cellules épithéliales luminales cubiques. Cet épithélium luminal simple est parsemé de glandes sécrétrices, où l'on retrouve les cellules épithéliales glandulaires, qui ont pour fonction de sécréter le mucus utérin, appelé histotrophe ou lait utérin. L'histotrophe est produit surtout durant le dioestrus et au début de la gestation et sert à nourrir le conceptus (embryon et parties extra-embryonnaires) (Mitko *et al.*, 2008). Sous les cellules épithéliales se trouvent les cellules stromales de l'endomètre qui sont en fait des fibroblastes. Les différents types cellulaires que l'on retrouve dans l'endomètre n'ont pas la même fonction mais ils jouent tous un rôle important dans l'établissement et le maintien de la gestation (Fortier *et al.*, 1988). Chez la vache, la muqueuse utérine est parsemée d'une soixantaine de tubercules richement vascularisés, appelés caroncules ou cotylédons, disposés en 3 ou 4 rangées irrégulières le long des cornes utérines. En absence de gestation, ces caroncules forment des petites bosses arrondies de 1 ou 2 centimètres, creusées à leur surface (Bressou, 1978). Au début de la placentation, l'endomètre aglandulaire d'origine stromale recouvrant les caroncules fusionne avec les villosités du chorion, c'est-à-dire l'enveloppe extérieure de l'embryon, pour former des placentomes (Mansouri-Attia *et al.*, 2009). La placentation chez les ruminants est donc multiple et de type caronculaire. Elle a lieu sur des petites surfaces, mais à différents endroits, c'est-à-dire là où se trouvent les caroncules. La placentation permettra les échanges nutritifs et gazeux entre la mère et le fœtus. Vers la fin de la gestation, on retrouve habituellement une centaine de caroncules pouvant mesurer 15 centimètres de diamètre chacun (Bressou, 1978). Puisque l'implantation de l'embryon chez la vache n'est pas invasive, l'épaisseur de l'utérus varie très peu au cours du cycle oestral (Klein *et al.*, 2006), bien qu'il y ait une prolifération des glandes utérines durant le dioestrus (Bauersachs *et al.*, 2008).

c. Gènes utérins modulés durant le cycle oestral

Tout au long du cycle oestral, l'utérus de la vache laitière subit une transformation dynamique. Afin de coordonner ces changements morphologiques et fonctionnels, de nombreux gènes sont différenciellement exprimés tout au long du cycle (Arosh *et al.*, 2002; Bauersachs *et al.*, 2008; Bauersachs *et al.*, 2005; Mitko *et al.*, 2008). Une étude récente utilisant la technologie des micropuces à ADNc (acide désoxyribonucléique complémentaire) a permis d'identifier 269 gènes dont le niveau de transcription varie à différents moments du cycle œstral chez la vache laitière (Mitko *et al.*, 2008). Ces gènes sont impliqués dans différents processus, dont le remodelage de la matrice cellulaire, le transport ou la signalisation cellulaire, la croissance cellulaire, la réponse immunitaire, etc. Cet important remodelage de l'endomètre durant le cycle œstral sert à préparer le tissu utérin à recevoir un embryon.

D. Début de la gestation

a. Anatomie de l'embryon avant l'attachement à l'utérus

Chez la vache, l'embryon atteint le stade blastocyste environ 7 jours après la fécondation (Salisbury *et al.*, 1978). La couche de cellules qui entoure le blastocyste constitue le trophoblaste (voir figure 3). Les cellules du trophoblaste sont responsables de nourrir l'embryon avant la placentation et de sécréter une protéine signalant à l'utérus la présence d'un embryon : l'interféron-tau (IFN- τ) (Spencer *et al.*, 2007). Dès le 12^{ème} jour, les membranes extra-embryonnaires commencent à s'allonger et prennent un aspect filamenteux (Descoteaux *et al.*, 2009). La croissance et l'élongation du blastocyste en une forme filamenteuse et allongée sont stimulés par la progestérone (Spencer *et al.*, 2007).

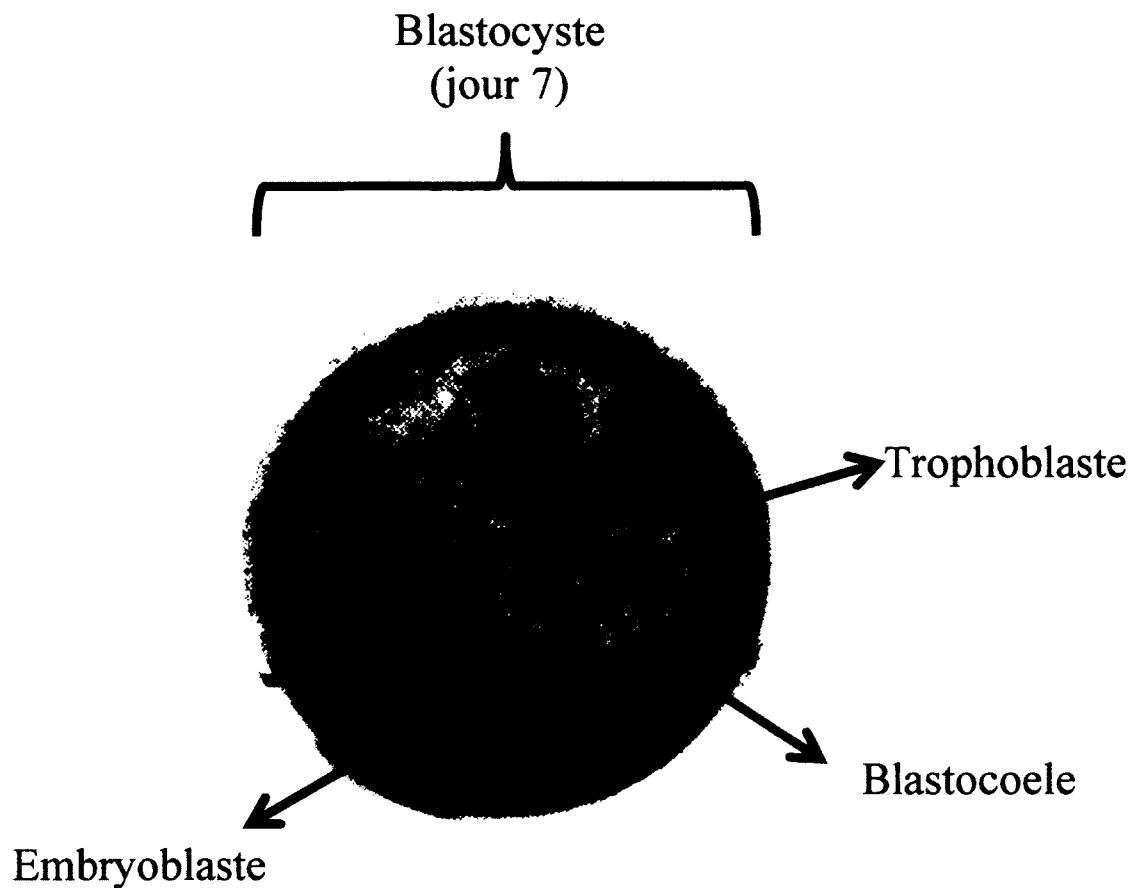


Figure 3 : Structures du blastocyste de la vache laitière au septième jour de gestation.

Le blastocyste est entouré d'une couche de cellules trophoblastiques, le trophoblaste, qui sécrète l'interféron-tau et qui signale à l'utérus la présence de l'embryon. À l'intérieur du blastocyste, une masse de cellules internes, appelée embryoblaste, formera l'embryon. La cavité du blastocyste, aussi appelée blastocoele, est remplie de liquide composé d'eau et de sels.

Image tirée de Massip *et al.* (1982)

Dès le 17^{ème} jour suivant la fécondation, le conceptus a une forme particulière ressemblant à un long tube filamenteux et il occupe alors la totalité de la corne utérine ipsilatérale au corps jaune. Au total, sa longueur atteint une quarantaine de centimètres. Le trophoblaste se retrouve donc en contact avec l'endomètre de la corne utérine sur toute sa longueur. L'embryon lui-même n'a alors que 2 millimètres de diamètre (Descoteaux *et al.*, 2009).

b. Attachement du blastocyste

Pour que la gestation puisse s'établir chez la vache, l'embryon doit absolument s'attacher à l'utérus aux jours 18 à 21 suivant la fécondation (Descoteaux *et al.*, 2009). Cet attachement, aussi appelé implantation, nécessite une reconnaissance materno-fœtale (Thatcher *et al.*, 2001). Pour que l'embryon survive, le blastocyste doit efficacement signaler sa présence aux cellules de l'utérus et l'utérus doit être compétent pour reconnaître ce signal. Pour ce faire, à partir du 9^{ème} jour de gestation, l'IFN- τ est sécrété dans la lumière de l'utérus par les cellules trophoblastiques du conceptus (Wang et Goff, 2003). L'IFN- τ est le signal de reconnaissance de la gestation chez les ruminants. La sécrétion d'IFN- τ augmente jusqu'au jour 17 et diminue par la suite (Wang et Goff, 2003) et peut persister jusqu'au jour 28 suivant la fécondation (Arosh *et al.*, 2004). Le rôle majeur de l'IFN- τ est d'inhiber la sécrétion pulsatile de PGF_{2 α} par les cellules épithéliales endométriales en bloquant l'action de l'oxytocine (Xiao *et al.*, 1999). Cette diminution de sécrétion de PGF_{2 α} permettra le maintien du corps jaune. La production de progestérone par le corps jaune se poursuivra et par conséquent, la gestation sera maintenue. L'IFN- τ est donc considéré comme une protéine anti-lutéolytique. L'IFN- τ a également comme fonction de moduler la transcription de nombreux gènes utérins afin de faciliter l'implantation du blastocyste et l'établissement de la gestation (Bauersachs *et al.*, 2006; Wang et Goff, 2003). Ce facteur agit également sur la sécrétion de plusieurs protéines par les cellules endométriales (Wang et Goff, 2003). Une fois que l'endomètre aura reconnu le signal de l'embryon, il y aura placentation et les structures extra-

embryonnaires s'attacheront à l'endomètre, au niveau des caroncules. Si le conceptus ne réussit pas à s'attacher à l'utérus, la gestation sera interrompue et l'embryon mourra. S'il y a mort embryonnaire, le conceptus dégénérera et sera dégradé en débris de tissus qui seront éliminés (Descoteaux *et al.*, 2009).

c. Gènes utérins impliqués dans l'implantation

Dans une récente étude, 179 gènes endométriaux ont été identifiés, à l'aide de micropuces à ADNc, comme ayant une abondance d'ARNm (acide ribonucléique messenger) plus importante chez les vaches gestantes comparé aux vaches non gestantes (Bauersachs *et al.*, 2006). Au moins 41 de ces gènes sont connus pour être induits par les interférons de type 1, dont fait partie l'IFN- τ (Bauersachs *et al.*, 2008). Ces gènes sont donc probablement induits par l'IFN- τ et pourraient être impliqués dans la croissance et le développement de l'embryon, le remodelage de l'endomètre permettant l'attachement de l'embryon, dans la modulation du système immunitaire ou dans la régulation de la transcription. De plus, il a été démontré que l'IFN- τ module l'expression de plusieurs gènes dans les cellules endométriales (Bauersachs *et al.*, 2006; Wang et Goff, 2003). Bien que le rôle de quelques-uns de ces gènes ait été identifié, la fonction précise de tous les gènes régulés par l'IFN- τ n'est pas encore bien définie pour l'instant. Parmi ces gènes, on retrouve entre autres ISG15 ubiquitin-like modifier (*ISG15*), qui régule la fonction de plusieurs protéines, interferon regulatory factors 1 et 2 (*IRF1* et *IRF2*), des facteurs de transcription, ainsi que 2',5'-oligoadenylate synthetase 1 et 2 (*OAS1* et *OAS2*). Une corrélation inverse entre PGF_{2 α} et *OAS1* a été observée dans des explants utérins traités avec l'interféron-tau et l'interféron-alpha (Schmitt *et al.*, 1993) suggérant ainsi que *OAS1* pourrait favoriser la diminution de la production de PGF_{2 α} par les cellules endométriales. Il a également été démontré que l'IFN- τ réduit l'abondance d'ARNm du gène codant pour la prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), une enzyme impliquée dans la synthèse de PGF_{2 α} (Mattos *et al.*, 2003).

d. Rôle de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ et de la PGE_2 dans la reproduction chez la vache

Les prostaglandines (PG) jouent un rôle important dans la régulation des fonctions reproductrices chez la vache laitière. En effet, les PG sont impliquées dans l'ovulation, la fécondation, l'implantation de l'embryon et la mise bas (Abayasekara et Wathes, 1999). En début de gestation, les PG sont synthétisées par les cellules endométriales à partir de leurs précurseurs; les acides gras polyinsaturés.

Un des problèmes majeurs en reproduction chez la vache laitière est que la mortalité embryonnaire est élevée en début de gestation. Environ 40% des cas de mortalité embryonnaire surviennent entre les jours 8 et 17 de la gestation (Thatcher *et al.*, 1994). Cela correspond au moment où l'IFN- τ produit par le trophoblaste diminue la sécrétion de $\text{PGF}_{2\alpha}$ par les cellules endométriales. Le rôle de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ au début de la gestation a été décrit précédemment (voir section D. b.). Il est de plus en plus accepté que la mortalité embryonnaire survenant en début de gestation serait due à une incapacité d'inhiber efficacement la sécrétion de $\text{PGF}_{2\alpha}$ au moment de la péri-implantation chez les ruminants. La première cause de mortalité embryonnaire serait effectivement reliée à l'incapacité de l'embryon à empêcher la lutéolyse (Mann *et al.*, 1999). De plus, il a été démontré que l'augmentation de sécrétion de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en début de gestation peut causer la perte embryonnaire (Lemaster *et al.*, 1999; Seals *et al.*, 1998). Dans cette optique, le développement de stratégies visant à inhiber davantage la sécrétion de $\text{PGF}_{2\alpha}$ par l'utérus en début de gestation pourrait augmenter les chances de survie embryonnaire et du même coup, les taux de fertilité (Petit *et al.*, 2009). La $\text{PGF}_{2\alpha}$ ne serait pas la seule prostaglandine jouant un rôle déterminant pour la survie embryonnaire. En effet, par opposition à la $\text{PGF}_{2\alpha}$, la prostaglandine E 2 (PGE_2) est considérée comme un agent lutéoprotecteur, c'est-à-dire qu'elle assure le maintien du corps jaune, favorisant ainsi le maintien de la gestation (Arosh *et al.*, 2004; Parent *et al.*, 2002; Pratt *et al.*, 1977). Une augmentation du ratio $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ pourrait donc contribuer à améliorer la survie embryonnaire (Arosh *et al.*, 2004; Parent *et al.*, 2002). Dans le tissu endométrial, la

PGF_{2α} est majoritairement produite par les cellules épithéliales et la PGE₂ est surtout produite par les cellules stromales (Fortier *et al.*, 1988).

E. Les acides gras polyinsaturés

Les acides gras (AG) polyinsaturés sont des AG à longues chaînes de carbone (18 à 22 carbones) qui possèdent plusieurs doubles liaisons carbone-carbone (C-C) (Fuller *et al.*, 2004). Ils proviennent de l'alimentation et les différents AG polyinsaturés sont incorporés dans les phospholipides des membranes cellulaires partout dans l'organisme, dans des proportions similaires à celles retrouvées dans la diète (Wathes *et al.*, 2007). Les AG polyinsaturés agissent sur la composition et la fonction des membranes, sur les voies de signalisation et sur la régulation de l'expression des gènes (Jump, 2002). De plus, vu leur structure particulière, les AG polyinsaturés augmentent la fluidité membranaire (Schmitz et Ecker, 2008).

a. Structure des différents acides gras polyinsaturés

Les AG polyinsaturés se divisent en deux familles : les oméga-3 (n-3) et les oméga-6 (n-6). Pour les AG n-3, le premier double lien C-C est entre les atomes de carbone 3 et 4, à partir du groupement méthyle (CH₃) terminal. Dans le cas des AG n-6, le premier double lien se trouve entre le carbone 6 et 7 (Fuller *et al.*, 2004). On peut donc désigner les différents AG polyinsaturés selon le nombre d'atomes de carbone (C) qu'ils contiennent et le nombre de double lien dans la molécule (e.g. C18:3, n-3) (voir figure 4) L'acide linoléique (LA, n-6) et l'acide alpha-linolénique (ALA, n-3) sont dits essentiels, car ils ne peuvent pas être synthétisés de novo (Abayasekara et Wathes, 1999) et doivent donc provenir de l'alimentation. Chez les mammifères, ces AG peuvent ensuite être modifiés après leur ingestion pour donner d'autres AG de la même famille avec des propriétés

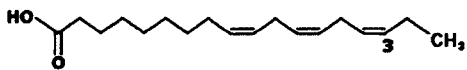
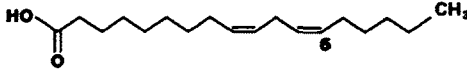
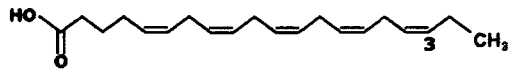
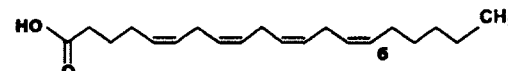
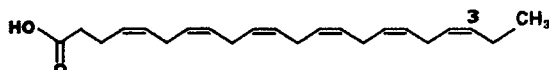
Acides gras oméga-3	Acides gras oméga-6
 <p>Acide alpha-linolénique (ALA) C18:3 n-3</p>	 <p>Acide linoléique (LA) C18:2 n-6</p>
 <p>Acide éicosapentaénoïque (EPA) C20:5 n-3</p>	 <p>Acide arachidonique (AA) C20:4 n-6</p>
 <p>Acide docosahéxaénoïque (DHA) C22:6 n-3</p>	

Figure 4 : Structure des principaux acides gras polyinsaturés.

Les acides gras oméga-3 ont leur premier double lien carbone-carbone (C-C) sur le troisième atome de carbone en partant du groupement méthyle (CH₃) de l'acide gras. Dans le cas des oméga-6, le premier double lien C-C se situe sur le sixième atome de carbone en partant du groupement méthyle. Le nom chimique des acides gras débute par le nombre total de carbones dans la molécule, suivit du nombre de doubles liens C-C et de l'emplacement du premier double-lien C-C.

Inspiré de Din et al. (2004).

biochimiques différentes, grâce à différentes étapes d'élongation et de désaturation (voir figure 5). Chez les animaux, les acides gras n-3 ne peuvent pas être convertis en acides gras n-6 et vice versa (Mattos *et al.*, 2000). Les élongases ajoutent deux carbones aux AG, tandis que les désaturases insèrent un nouveau double lien C-C. Grâce à ces enzymes, l'acide arachidonique (AA) (C20:4, n-6) est formé à partir du LA (C18:2, n-6) et l'acide éicosapentaénoïque (EPA) (C20:5, n-3) est formé à partir de l'ALA (C18:3, n-3). Cette conversion a lieu dans le réticulum endoplasmique (Burdge et Calder, 2005) des cellules de différents organes (Mattos *et al.*, 2000). Les AG n-6 et n-3 utilisent les mêmes enzymes élongases et désaturases (Abayasekara et Wathes, 1999). Il y a donc une compétition entre l'élongation et la désaturation des n-6 et des n-3. Cependant, il a été démontré que dans les cellules humaines, la conversion de l'ALA en EPA via l'enzyme delta-désaturase se faisait préférentiellement à la conversion du LA en AA (Emken *et al.*, 1990).

b. Dérivés des acides gras polyinsaturés

Les acides gras représentent une source d'énergie et peuvent être utilisés pour produire de l'adénosine triphosphate (ATP) via la β -oxydation (Jump, 2002). Les AG polyinsaturés servent aussi de précurseur à la synthèse de facteurs bioactifs. Les différents acides gras sont emmagasinés dans les membranes cellulaires sous forme estérifiées, c'est-à-dire qu'ils sont liés à un phospholipide. Les AG polyinsaturés sont d'abord libérés de la membrane en se détachant de leur phospholipide suite à l'action de la *phospholipase A 2* (PLA₂) (Wathes *et al.*, 2007). Ils se retrouvent alors dans le cytoplasme sous forme d'AG libres et sont immédiatement métabolisés par différents enzymes qui se font compétition. L'AA et l'EPA servent de précurseur pour la synthèse des eicosanoïdes, des molécules constituées de 20 atomes de carbone, qui comprennent les prostanoïdes (prostaglandines et thromboxanes), les leucotriènes, les lipoxines, les acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs), les acides époxyeicosatriénoïques (EETs), les résolvines et les neuroprotectines (voir figure 5). Tous ces facteurs sont impliqués dans divers processus cellulaires ou

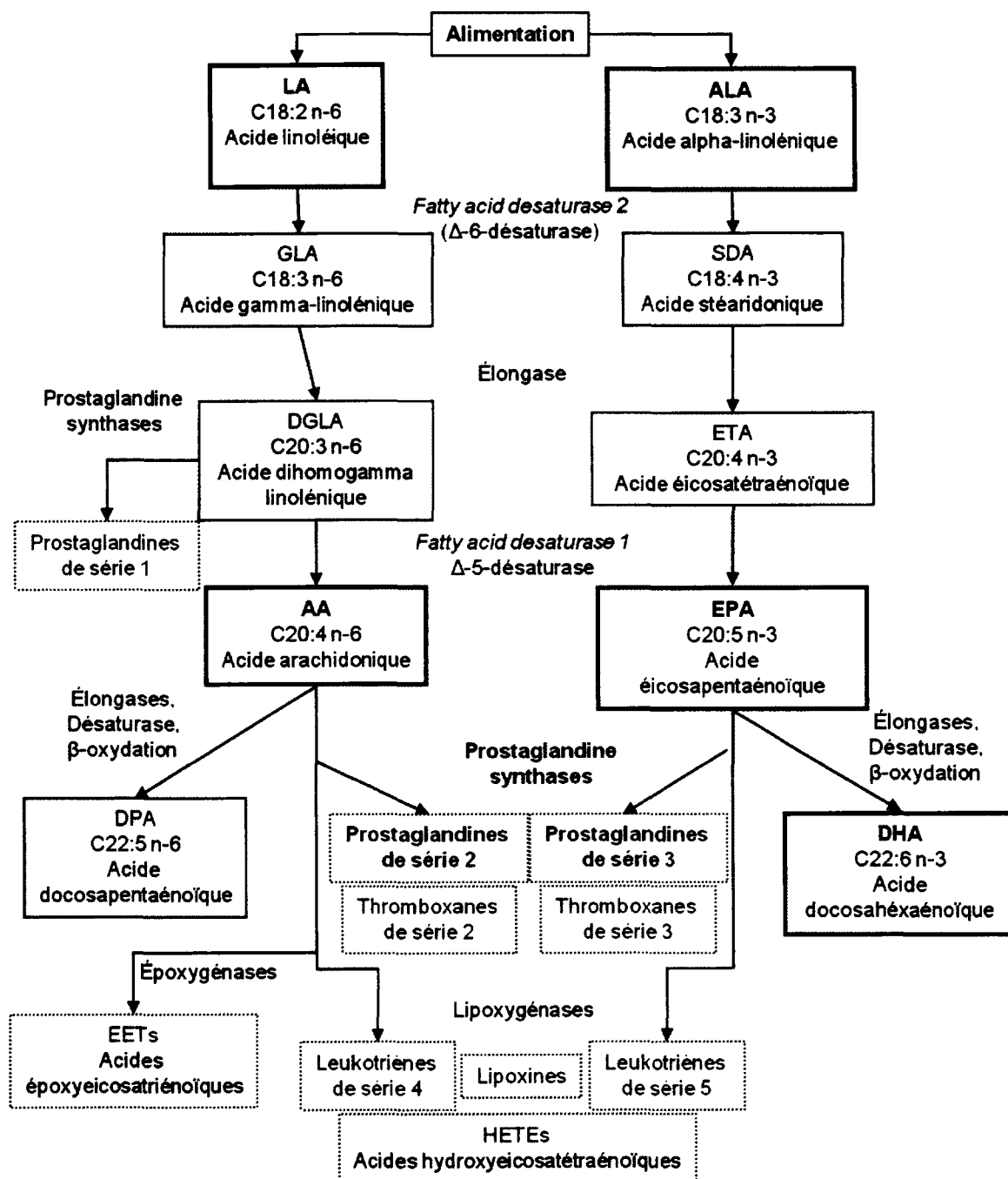


Figure 5 : Conversion des acides gras polyinsaturés et de leurs différents dérivés.

Les voies métaboliques des acides gras oméga-6 et oméga-3 utilisent les mêmes enzymes pour l'élongation, la désaturation et la production de différents dérivés.

Inspiré de Abayasekara et Wathes (1999) et Schmitz et Ecker (2008).

tissulaires (Fuller *et al.*, 2004). Les facteurs produits à partir des AG n-6 ont souvent des fonctions inverses à ceux produits à partir des AG n-3. En effet, les dérivés de l'AA (n-6) ont des fonctions pro-arythmiques, pro-inflammatoires, activent les plaquettes et favorisent la vasoconstriction. Les dérivés de l'EPA (n-3), quant à eux, ont des effets anti-arythmiques, anti-inflammatoires, inhibent les plaquettes et favorisent la vasodilatation (Schmitz et Ecker, 2008). Il y a une compétition entre les AG n-3 et n-6, car ils utilisent les mêmes enzymes pour la synthèse de leurs dérivés respectifs (Wathes *et al.*, 2007). Puisque les AG polyinsaturés sont incorporés dans les tissus dépendamment de la quantité de leur précurseur présent dans l'alimentation, il a été suggéré qu'une augmentation d'apport alimentaire en n-3 pourrait favoriser davantage le métabolisme des n-3 au dépend de celui des n-6 à l'intérieur des cellules de l'endomètre (Mattos *et al.*, 2000). Plus exactement, en remplaçant les AG dans les membranes cellulaires par une plus grande proportion d'AG n-3, il y aurait une diminution de la disponibilité de l'AA et une production réduite de ses dérivés (Meier *et al.*, 2009). Il y a effectivement plusieurs évidences démontrant que les variations de quantités d'AG polyinsaturés dans la diète peuvent avoir des effets majeurs sur la synthèse des écosanoïdes (Abayasekara et Wathes, 1999) et plusieurs exemples au niveau de la reproduction seront présentés plus loin (voir section H).

F. Synthèse des prostaglandines

Les différentes prostaglandines sont synthétisées à partir des AG polyinsaturés une fois qu'ils sont libérés de la membrane cytoplasmique via l'action de la PLA₂. La figure 6 présente la voie de synthèse des prostaglandines de série 2 et de série 3. L'AA (n-6) servira de précurseur à la synthèse des PG de série 2, desquelles font partie la PGF_{2α} et la PGE₂. Les PG de série 3 quant à elles sont produites à partir de l'EPA (n-3) (Schmitz et Ecker, 2008). Les acides gras AA ou EPA sont respectivement convertis en prostaglandines H 2 (PGH₂) et prostaglandines H 3 (PGH₃) par les enzymes *prostaglandin-endoperoxide synthases 1 et 2* (PTGS1 et PTGS2) (Mattos *et al.*, 2000).

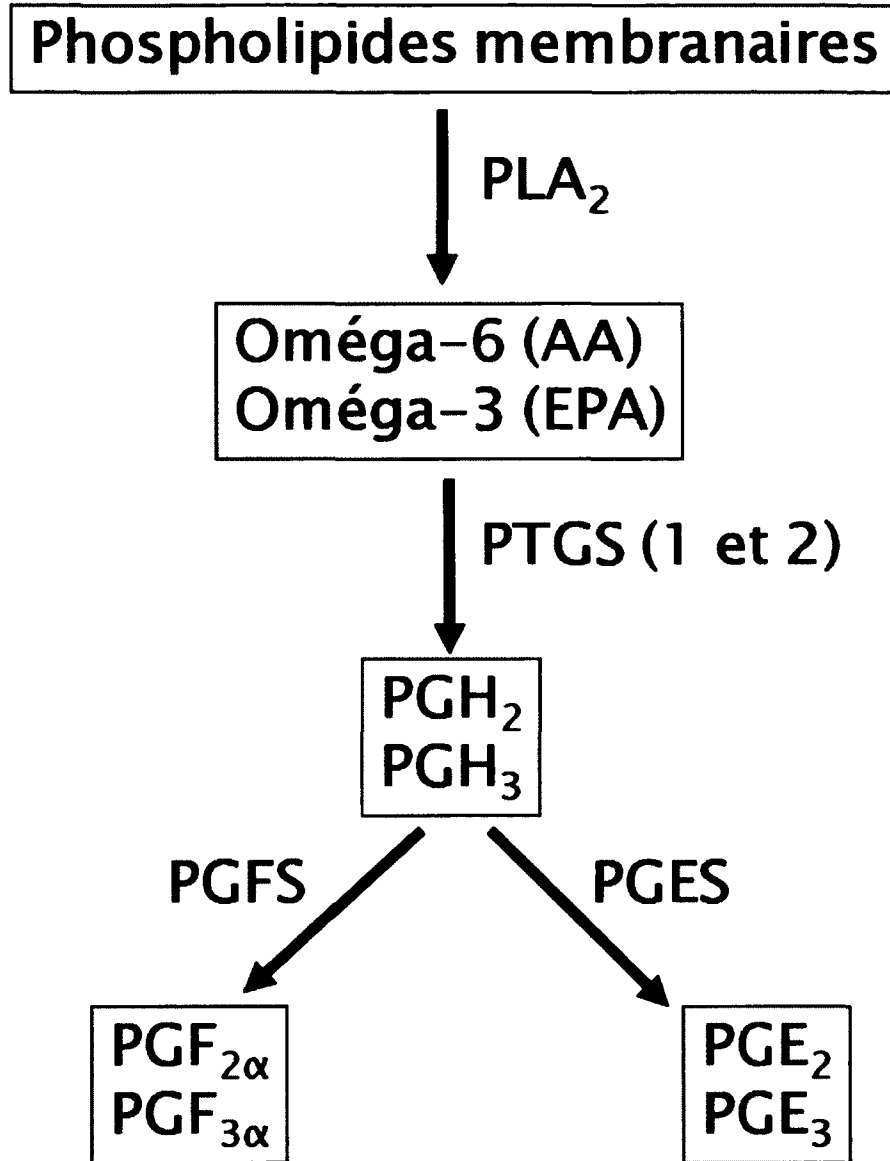


Figure 6 : Synthèse des prostaglandines.

En rouge : voie à partir des acides gras oméga-6. En bleu : voie à partir des acides gras oméga-3. PLA₂ : *Phospholipase A 2*, AA : Acide arachidonique, EPA : Acide éicosapentaénoïque, PTGS : *Prostaglandin-endoperoxide synthase*, PGH : Prostaglandine H, PGFS : *Prostaglandine F synthases*, PGES : *Prostaglandines E synthases*, PGF : Prostaglandine F, PGE : Prostaglandine E.

Inspiré de Mattos *et al.* (2000) et Wathes *et al.* (2007).

Ces deux enzymes ont une structure et une fonction similaire, mais leur expression est régulée différemment (Smith et Dewitt, 1996). La PTGS1 est exprimée de façon constitutive tandis que l'expression de la PTGS2 peut être régulée de différentes manières. La PGH₂ produite via ces enzymes sert ensuite de précurseur pour la synthèse de la PGF_{2α} et de la PGE₂ et la PGH₃ est convertie en prostaglandine F 3 alpha (PGF_{3α}) et en prostaglandine E 3 (PGE₃) (Mattos *et al.*, 2003). Les prostaglandines F (PGF) et les prostaglandines E (PGE) sont produites respectivement grâce à l'action des enzymes *prostaglandines F synthases* (PGFS) et *prostaglandines E synthases* (PGES) (Wathes *et al.*, 2007).

Jusqu'à maintenant, trois enzymes PGES ont été identifiés, dont la *prostaglandine E synthase* (PTGES), qui serait la principale PGES responsable d'une augmentation de production de PGE₂ dans les cellules endométriales bovines *in vitro* (Parent et Fortier, 2005). Plusieurs PGFS ont aussi été décrites, lesquelles présentent un fort pourcentage d'homologie au niveau du gène (Madore *et al.*, 2003). Plusieurs PGFS sont de la famille des *aldo-keto reductases* (Goff, 2004; Madore *et al.*, 2003), dont fait partie l'*aldo-keto reductase family 1, member B1* (AKR1B1). L'enzyme AKR1B1 a été identifiée comme étant la principale responsable de la synthèse de PGF_{2α} dans l'endomètre humain et l'inhibition de l'expression du gène *AKR1B1* entraîne la réduction de la synthèse de PGF_{2α} (Zakrzewska *et al.*, 2005). L'activité PGF synthase d'AKR1B1 a également été démontrée (Kabututu *et al.*, 2009). Puisque l'AA et l'EPA sont convertis en PG par les mêmes enzymes et que les deux types d'AG se font compétition pour l'accès à ces enzymes, l'augmentation de la disponibilité d'oméga-3 dans les membranes de phospholipides par rapport aux oméga-6 pourrait entraîner une diminution de la synthèse de PG de série 2 en favorisant la synthèse de PG de série 3 (Thatcher *et al.*, 2001). Dans l'animal, la PGF_{2α} et la PGE₂ sont rapidement converties en métabolites inactifs; le 13,14-dihydro-15-keto-PGF_{2α} (PGFM) et le Prostaglandin E metabolite (PGEM), respectivement (Tai *et al.*, 2002). Ce sont ces métabolites qui sont dosés dans le sang de l'animal afin d'évaluer les niveaux de PGF_{2α} et de PGE₂.

a. Source alimentaire des acides gras polyinsaturés chez la vache

Les vaches laitières sont nourries surtout de plantes fourragères et de céréales, ainsi que de divers suppléments alimentaires où elles peuvent aller chercher les acides gras polyinsaturés dont elles ont besoin. Les plantes fourragères contiennent peu d'acides gras, mais 55-65% de ces AG sont des oméga-3 ALA (Chilliard *et al.*, 2000a). Ces plantes peuvent être broutées fraîches dans les pâturages, mais sont souvent servies sous forme de foin séché. Cependant, l'ensilage des plantes fourragères peut altérer leur teneur en ALA (Chilliard *et al.*, 2000a). Les plantes fourragères sont la luzerne, le trèfle et plusieurs espèces de graminées. Les céréales, quant à elles, sont riches en oméga-6 LA. Les céréales données aux vaches laitières sont le blé, l'avoine, l'orge et surtout le maïs. Dans le cas du maïs ensilé, 60% des AG sont sous forme de LA (Chilliard *et al.*, 2000a). L'oméga-6 le plus présent dans l'alimentation des vaches est donc le LA, qui peut être converti en AA. Les vaches laitières peuvent aussi être nourries avec des suppléments de graines de soja, graines de tournesol, de graine de lin ou même de farines ou d'huiles de poisson, toutes d'excellentes sources d'acides gras polyinsaturés. Parmi ces suppléments, la graine de lin et les huiles de poisson sont d'importantes sources d'AG oméga-3, alors que les graines de soja et de tournesol sont riches en AG oméga-6. Dans les végétaux tel que la graine de lin on retrouve uniquement l'ALA comme source d'oméga-3 et l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'EPA, deux AG n-3, se retrouvent uniquement dans les huiles de poisson (Fuller *et al.*, 2004). Chez les mammifères, l'ALA est le seul oméga-3 essentiel, car le DHA et l'EPA peuvent être synthétisés à partir de l'ALA (Schmitz et Ecker, 2008). Toutefois, l'huile de poisson peut être donné comme supplément alimentaire aux vaches laitières afin qu'elles aient un apport direct en DHA et EPA.

Dans les dernières décennies, l'alimentation des vaches laitières a été modifiée en raison de l'intensification de la production (Dewhurst *et al.*, 2003). Les animaux vont de moins en moins à l'extérieur et ne se nourrissent plus dans les pâturages, se retrouvant ainsi à consommer davantage de céréales. Bien évidemment, la composition nutritive des plantes

fraîches au champ et des grains d'ensilage est différente, principalement en ce qui concerne le ratio d'acides gras oméga-6/oméga-3. Par conséquent, comparées à des vaches libres en pâturage, les vaches laitières des fermes à production intensive ont une diète dont le ratio n-6/n-3 est beaucoup plus élevé (Dewhurst *et al.*, 2003). Vu le rôle important des AG dans la synthèse des prostaglandines, qui elles sont impliquées dans diverses fonctions reproductrices, ce changement d'alimentation pourrait être une des causes du déclin de fertilité observé chez la vache laitière.

G. La graine de lin

a. Importance économique de la graine de lin

Le Canada est de loin le plus important producteur mondial de graine de lin, avec le tiers de la production mondiale. Le Canada est également le principal pays exportateur de graine de lin (Thompson et Cunnane, 2003). Bien que la graine de lin soit cultivée et utilisée dans l'alimentation depuis des milliers d'années, les bienfaits alimentaires de cette plante pour la santé humaine et animale ont récemment été démontrés. Il y a donc un engouement général pour la graine de lin et les bénéfices qu'elle procure comme aliment fonctionnel, ce qui entraîne une augmentation de sa production.

b. Composition nutritive de la graine de lin

La graine de lin est très riche en fibres et constitue un apport important en protéines et en acides gras polyinsaturés. En effet, la graine de lin est composée d'environ 44% d'huile et elle est particulièrement riche en ALA (n-3), qui compte pour plus de la moitié des AG totaux (56% des AG totaux) (Thompson et Cunnane, 2003). La graine de lin contient

également plusieurs micronutriments, c'est-à-dire des minéraux, des vitamines et des lignanes. Les lignanes sont des composés phénoliques complexes et des métabolites secondaires chez la plante. Ces métabolites sont solubles, peuvent être absorbés par le système digestif des vaches et ont des effets physiologiques chez les animaux (Fuller *et al.*, 2004; Thompson et Cunnane, 2003). Une lignane importante retrouvée dans la graine de lin est le secoisolariciresinol diglucoside (SDG). En effet, la graine de lin est l'une des principales sources alimentaires de SDG (Gagnon *et al.*, 2009). Une fois métabolisé par les bactéries du rumen chez la vache, cette lignane se transforme en entérodiol, qui est ensuite oxydé pour former l'entérolactone (ENL). L'entérolactone est le principal métabolite du SDG qui est produit par la microflore du rumen et qui est absorbé par la vache. De plus, l'ENL est détectable dans le plasma, l'urine et le lait chez les vaches laitières ayant reçu des suppléments de graine de lin (Gagnon *et al.*, 2009), alors que l'entérodiol n'est pas détectable dans le lait (Petit, 2010). Il a été suggéré que l'ENL pourrait agir comme phytoestrogène et qu'il possède des propriétés antioxydantes (Adolphe *et al.*, 2010; Petit et Gagnon, 2009). Grâce à ces propriétés, l'ENL pourrait aussi avoir un impact sur les fonctions reproductrices de la vache laitière.

H. Effets des acides gras n-3 et n-6 sur la reproduction des vaches laitières

Les acides gras polyinsaturés jouent un rôle déterminant dans le bon fonctionnement de la reproduction chez les bovins (Abayasekara et Wathes, 1999). De plus, il est maintenant bien connu que les acides gras peuvent moduler l'expression de différents gènes et par conséquent, réguler diverses fonctions cellulaires (Grimaldi, 2001). Les acides gras alimentaires influencent les fonctions ovariennes et utérines chez la vache en modifiant la composition en acides gras des membranes de phospholipides (Robinson *et al.*, 2002). Cependant, tous les acides gras n'ont pas les mêmes effets et les acides gras oméga-3 semblent être plus bénéfiques pour la reproduction que les acides gras oméga-6 (Petit *et al.*, 2009).

Lorsque des vaches sont nourries avec des AG n-3, la quantité d'AG n-3 retrouvée dans le plasma, le lait et le tissu utérin augmente (Burns *et al.*, 2003). Chez la vache laitière, il a été démontré qu'une supplémentation alimentaire en EPA et DHA augmentait la concentration d'EPA retrouvée dans le tissu utérin (Mattos *et al.*, 2004). Finalement, il a été démontré que les n-3 agissent un peu comme des hormones en activant ou en modulant l'abondance de certains facteurs de transcription, comme c'est le cas pour le *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPAR α) ou encore pour le *nuclear factor kappa B* (NF κ B) (Jump, 2002).

a. Effets *in vivo* des acides gras polyinsaturés

Chez la vache laitière, plusieurs études ont démontré l'effet *in vivo* d'un supplément alimentaire riche en AG n-3 sur la reproduction, la synthèse de prostaglandines et l'expression des gènes. En effet, lorsque les vaches reçoivent un supplément de graines de lin entières, le taux de conception est significativement augmenté par rapport aux vaches ayant reçu un supplément de Mégalac® (acides gras saturés) (Petit *et al.*, 2001). Une diète riche en graines de lin, donc en ALA, entraîne aussi une diminution de mortalité embryonnaire comparée à une diète riche en LA chez les vaches laitières (Ambrose *et al.*, 2006; Petit et Twagiramungu, 2006).

Il a été démontré que le fait de nourrir des vaches avec un supplément de farine de poissons, riche source d'AG n-3 EPA et DHA, entraîne une diminution de synthèse de PGF_{2 α} dans l'utérus (Mattos *et al.*, 2004). Une autre étude a examiné l'effet de différents suppléments d'AG alimentaires; graines de lin (n-3), graines de tournesol (n-6), Mégalac® et aucun supplément, chez des vaches laitières. Les résultats de cette étude ont démontré que les vaches nourries avec un supplément de graines de lin présentent une diminution des PGFM circulants, donc une diminution de synthèse de PGF_{2 α} . À l'opposé, une augmentation de PGFM sanguin est observée lorsque les vaches sont nourries avec

un supplément de graine de tournesol, riche en LA (Petit *et al.*, 2002). Une autre étude a démontré que lorsque les vaches reçoivent une diète riche en LA (n-6), la concentration en PGFM augmente dans le sang au jour 17 du cycle oestral comparé aux vaches supplémentées en ALA (n-3) ou aux vaches contrôles (Robinson *et al.*, 2002). Lessard *et al.* (2003) ont aussi observé une diminution de PGE₂ dans le sérum des vaches au jour 20 de la gestation lorsqu'elles sont nourries avec un supplément de graines de lin comparé aux vaches nourries avec un supplément de Mégalac® ou de fèves de soja. Ces différentes études suggèrent donc qu'une diète riche en n-3 pourrait améliorer la survie de l'embryon via une diminution de la synthèse de prostaglandines de série 2 au moment de la période de péri-implantation.

Outre la diminution de PGF_{2α}, la diminution de la mortalité embryonnaire observée avec un supplément d'oméga-3 pourrait être due à une réponse immunitaire favorisant davantage l'implantation de l'embryon (Lessard *et al.*, 2003). Les résultats de cette étude démontrent qu'une alimentation riche en graine de lin réduit la réponse proliférative des lymphocytes et monocytes au moment de l'implantation de l'embryon, ce qui pourrait aider à maintenir l'intégrité de l'embryon. Finalement, chez des vaches au jour 17 de la gestation (période de péri-implantation), une diète enrichie d'un supplément de graines de lin (10%) modifie l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'établissement et le maintien de la gestation et ce, autant dans l'embryon que dans l'utérus (Palin *et al.*, 2009). Collectivement, ces études démontrent qu'une diète riche en n-3 pourrait donc améliorer la fertilité des vaches laitières. Cependant, lorsqu'il s'agit d'améliorer la fertilité, les résultats d'une étude récente suggèrent que le ratio n-6/n-3 est aussi un facteur important qu'il faut considérer et que celui-ci est peut-être même plus important que la quantité absolue de n-3 disponible (Caldari-Torres *et al.*, 2006). Il y a effectivement une diminution du ratio n-6/n-3 dans le sang lorsque les vaches sont nourries avec un supplément d'oméga-3, (Lessard *et al.*, 2003; Petit, 2003; Petit *et al.*, 2004). Ces différentes études démontrent que les AG alimentaires peuvent avoir un effet sur la reproduction en modulant la synthèse des prostaglandines et l'expression des gènes de même qu'en modulant la réponse immunitaire pour empêcher le rejet de l'embryon.

b. Effets *in vitro* des acides gras polyinsaturés

Plusieurs études ont également été réalisées sur des cellules endométriales en culture afin de mieux comprendre les mécanismes d'action des AG n-3 et n-6 et leurs effets directs sur les fonctions des cellules utérines bovines en lien avec la reproduction. Par exemple, en utilisant une lignée de cellules immortalisées épithéliales endométriales bovines, les cellules BEND, l'ajout de 100 micromole/litre (μM) d'EPA, de DHA ou d'ALA, tous des n-3, a permis de diminuer la sécrétion de $\text{PGF}_{2\alpha}$, alors que l'ajout d'AA fait augmenter la sécrétion de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Caldari-Torres *et al.*, 2006; Mattos *et al.*, 2003). Selon les auteurs, ces résultats peuvent s'expliquer par la compétition entre les AG pour les enzymes PTGS. Outre la compétition entre les acides gras pour les enzymes PTGS, il a été démontré que l'EPA inhibe l'activité des enzymes PTGS (Ringbom *et al.*, 2001). Cette inhibition des enzymes pourrait également expliquer la diminution de sécrétion de $\text{PGF}_{2\alpha}$ par les cellules BEND en présence d'EPA. Les AG DHA, ALA et LA sont aussi des inhibiteurs des PTGS (Ringbom *et al.*, 2001). Il a également été démontré que l'inhibition de la sécrétion de $\text{PGF}_{2\alpha}$ par l'EPA est annulée par une augmentation du ratio n-6/n-3 (Caldari-Torres *et al.*, 2006), suggérant ainsi que la synthèse des PG serait plus influencé par le ratio n-6/n-3 que par la quantité absolue d'oméga-3. Puisque les AG sont incorporés dans la membrane avant d'être métabolisés, la réduction du ratio n-6/n-3 pourrait donc diminuer la disponibilité des n-6 membranaires au profit des n-3.

I. Effets de l'entérolactone sur la reproduction.

La graine de lin, en plus de contenir une importante quantité d'ALA, contient également des lignanes, dont le SDG, qui est métabolisé en ENL par les bactéries du rumen de la vache (Gagnon *et al.*, 2009). L'ENL est une phytoestrogène qui a une structure similaire à celle des oestrogènes naturelles ou synthétiques et peut donc faire compétition à l'oestradiol en liant les récepteurs de l'oestrogène (Adolphe *et al.*, 2010). Par conséquent,

il a été suggéré que l'ENL aurait des effets faiblement oestrogéniques et anti-oestrogéniques. L'œstrogène étant une hormone sexuelle d'importance majeure chez les femelles mammifères, l'ENL pourrait avoir un effet sur les fonctions reproductrices. De plus, l'ENL est un puissant antioxydant. À ce titre, l'ENL a une activité antioxydante 4,3 fois supérieure à celle de la vitamine E (Prasad, 2000). Suite à une étude chez l'humain, il a été suggéré que le stress oxydatif pourrait être un des facteurs causant l'infertilité (Friggens *et al.*, 2010). Plusieurs études réalisées chez différentes espèces animales, dont les vaches laitières, démontrent également que le stress oxydatif est nuisible au succès reproducteur en début de gestation (Al-Gubory *et al.*, 2010) et pourrait causer la mort embryonnaire (Celi *et al.*, 2011). Puisque l'ENL peut diminuer le stress oxydatif (Adolphe *et al.*, 2010), ceci pourrait favoriser l'établissement de la gestation et la survie embryonnaire. En effet, des injections de vitamine E et de sélénium, deux antioxydants, ont amélioré la fertilité des vaches laitières (Arechiga *et al.*, 1998). De plus, il est démontré que la vitamine E favorise le développement des embryons bovins et ceux d'autres espèces *in vitro* (Olson et Seidel, 2000). Finalement, puisque l'ALA, qui est présent en grande quantité dans la graine de lin, est sensible à l'oxydation (Scislowski *et al.*, 2005), l'ENL pourrait favoriser le maintien de l'intégrité de cet AG et favoriser son action bénéfique sur la reproduction. Grâce à toutes ces propriétés, l'ENL pourrait avoir un impact positif sur la fertilité des vaches laitières. Toutefois, pour l'instant, les effets directs de l'ENL sur la fertilité chez la vache laitière n'ont pas encore été explorés.

J. Le projet de recherche

Présentement, l'industrie laitière est aux prises avec des problèmes de fertilité chez les vaches laitières. Un des problèmes majeurs observé en production laitière est l'important taux de mortalité embryonnaire qui survient le plus souvent au moment de la période de péri-implantation et qui serait surtout causé par l'incapacité de l'embryon à inhiber la sécrétion de PGF_{2α} par les cellules endométriales. Ainsi, les stratégies visant à diminuer la production de PGF_{2α} favoriseraient le maintien du corps jaune et la survie

embryonnaire. Puisque la $\text{PGF}_{2\alpha}$ et la PGE_2 (qui pourrait avoir un effet lutéoprotecteur) sont sécrétées par les cellules de l'endomètre, la fonction utérine joue un rôle majeur dans la survie et dans l'implantation embryonnaire. Le fait de supplémenter les rations des vaches laitières avec de la graine de lin (riche en n-3; ALA et en lignanes) a des effets bénéfiques sur le succès reproducteur en raison de la diminution de la mortalité embryonnaire associée à une diminution de la concentration de PGFM (métabolite de la $\text{PGF}_{2\alpha}$) dans le sang. Lorsqu'elle est donnée comme supplément alimentaire, la graine de lin entraîne une diminution du ratio n-6/n-3 (Lessard *et al.*, 2003; Petit, 2003; Petit *et al.*, 2004) et une augmentation de la concentration d'ENL dans le sang des vaches (Gagnon *et al.*, 2009). Cependant, on ne sait pas si l'effet bénéfique de la graine de lin sur la reproduction des vaches laitières est dû au ratio n-6/n-3, à l'ENL ou aux deux. De plus, lors d'une étude précédente menée au laboratoire du Dr. Palin, plusieurs gènes utérins, dont l'expression est modulée au jour 17 de la gestation par une diète contenant 10% de graines de lin, ont été identifiés (Palin *et al.*, 2009; Palin *et al.*, 2006). Parmi ces gènes, nous en avons sélectionné 16, lesquels sont impliqués dans la survie embryonnaire ou dans la synthèse des prostaglandines. Pour chacun de ces gènes, nous avons ensuite étudié plus en détail l'effet du traitement alimentaire sur leur niveau d'expression dans l'endomètre de la vache laitière.

a. Hypothèses et objectifs

Bien qu'il soit connu qu'une alimentation supplémentée en graine de lin parvient à améliorer la fertilité des vaches laitières *in vivo*, il manque encore des évidences pour démontrer comment les nutriments procurés par une alimentation riche en graine de lin favorisent l'implantation et la survie embryonnaire au niveau moléculaire, notamment dans les cellules endométriales bovines. L'objectif de cette étude était de vérifier si les effets bénéfiques de la graine de lin sur la survie embryonnaire sont dus à la modification du ratio n6/n-3 (LA/ALA) et/ou à l'ENL, ou aux deux dans des cellules endométriales bovines en culture primaire. Nos hypothèses de départ étaient :

- 1) Différents ratios n-6/n-3 (LA/ALA), de même que la présence d'ENL influencent directement le niveau d'expression de différents gènes de l'endomètre impliqués dans la survie embryonnaire ou dans la synthèse des prostaglandines chez la vache laitière.
- 2) La diminution du ratio n-6/n-3 entraîne une diminution de la sécrétion des prostaglandines de série 2 (PGF_{2α} et PGE₂) dans les cellules endométriales bovines.
- 3) La diminution du ratio n-6/n-3 entraîne une augmentation du ratio PGE₂/PGF_{2α} dans les cellules endométriales bovines.

Tout d'abord, afin de caractériser davantage le profil d'expression des 16 gènes sélectionnés *in vivo*, nous avons mesuré la variation du niveau d'ARNm de ces gènes dans l'endomètre bovin au cours du cycle oestral. Pour vérifier nos hypothèses, nous avons utilisé comme modèle d'étude deux types cellulaires de l'endomètre bovin en culture primaire; les cellules épithéliales (luminales et glandulaires combinées) et les cellules stromales. Nous avons comme objectifs de déterminer l'effet de 6 différents ratios n-6/n-3 (LA/ALA) et l'effet de 2 concentrations d'ENL sur les niveaux d'ARNm des 16 gènes sélectionnés et sur la sécrétion de prostaglandines de série 2; PGF_{2α}, PGE₂ et le ratio PGE₂/PGF_{2α}, dans les cellules endométriales en culture primaire, dans un contexte de péri-implantation embryonnaire.

b. Approche méthodologique

Les 16 gènes sélectionnés sont présentés dans le tableau 1. La caractérisation du profil d'expression de ces gènes durant le cycle oestral a tout d'abord été réalisée *in vivo* en utilisant des échantillons d'utérus de vaches laitière de race Holstein récupérés à l'abattoir. Le cycle oestral a été divisé en 4 stades, basés sur l'apparence macroscopique des ovaires. Pour chaque stade, des échantillons d'endomètre ont été prélevés sur 3 ou 4

animaux. À chaque prélèvement, des échantillons d'endomètre ont été recueillis dans les deux cornes utérines de la vache laitière (ipsilatérale ou contralatérale à l'ovaire portant le corpus luteum).

L'étude *in vitro* a été réalisée avec deux types de cellules endométriales en culture primaires, soit les cellules stromales (SC) et les cellules épithéliales (luminales et glandulaires) (EC), isolées à partir d'un utérus de vache laitière de race Holstein récupéré à l'abattoir. L'expérience, qui incluait un total de 13 traitements différents faits en duplicata, a été répétée avec quatre animaux pour chaque type cellulaire. Puisque l'objectif était de mieux comprendre comment les différentes composantes de la graine de lin peuvent améliorer la survie embryonnaire au moment de la péri-implantation, les cellules en culture primaire ont été étudiées dans un milieu de culture reconnu pour simuler la gestation. Pour ce faire, la progestérone et l'interféron-tau ont été ajoutés au milieu de culture. Des traitements contrôles ont été réalisés afin de confirmer que la progestérone et l'interféron-tau parvenaient à simuler la gestation dans les cellules en culture. Les cellules ont ensuite été traitées avec 6 différents ratios LA/ALA (0, 1, 4, 15, 25 et ∞), avec deux concentrations différentes d'ENL (1 μ M et 10 μ M), ainsi qu'avec des combinaisons d'acides gras (LA/ALA ratio of 4) et d'ENL (1 μ M ou 10 μ M). L'ARN total a été extrait des cellules en culture et le niveau d'ARNm a été mesuré par PCR quantitatif en temps réel (RT-qPCR) pour les 16 gènes sélectionnés. De plus, le milieu de culture a été recueilli pour chacun des traitements afin de mesurer par « enzyme immuno assay » (EIA) la sécrétion des $\text{PGF}_{2\alpha}$ et des PGE_2 par les cellules endométriales. Le ratio $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ a aussi été calculé pour chaque traitement.

Tableau 1 : Gènes sélectionnés parmi ceux différentiellement exprimés dans l'endomètre de vaches laitières ayant reçu un supplément de 10% de graines de lin^a.

Gènes sur-exprimés	Gènes sous-exprimés
Aldo-keto reductase family 1, member B1 (<i>AKR1B1</i>) (PGFS ^b)	Annexin A2 (<i>ANXA2</i>)
Prostaglandin E synthase (<i>PTGES</i>) (PGES ^b)	Connective tissue growth factor (<i>CTGF</i>)
Cytochrome P450, family 39, subfamily A, polypeptide 1 (<i>CYP39A1</i>)	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (<i>CXCL10</i>)
Dickkopf homolog 1 (<i>DKK1</i>)	Transforming growth factor, beta 1 (<i>TGFB1</i>)
FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (<i>FOS</i>)	
Gap junction protein, alpha 1, 43kDa (<i>GJA1</i>)	
Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (<i>IFIT3</i>)	
Interferon regulatory factor 6 (<i>IRF6</i>)	
ISG15 ubiquitin-like modifier (<i>ISG15</i>)	
2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa (<i>OAS1</i>)	
Prostate androgen-regulated mucin-like protein 1 (<i>PARM1</i>)	
Zinc finger protein 36, C3H type-like 1 (<i>ZFP36L1</i>)	

^a Sources: Palin *et al.*, 2009 et Palin *et al.*, 2006

^b PGFS: Prostaglandine F synthase, PGES: Prostaglandine E synthase.

CHAPITRE 1

ARTICLE SCIENTIFIQUE

1.1 Avant-propos

L'article qui suit présente les résultats obtenus dans le cadre de ce projet de maîtrise. L'objectif du projet était de déterminer l'effet de 6 différents ratios d'acides gras n-6/n-3 (LA/ALA) et/ou l'effet de 2 concentrations d'ENL sur le niveau d'ARNm de 16 gènes sélectionnés et sur la sécrétion de prostaglandines de série 2 dans les cellules endométriales stromales et épithéliales en culture primaire. Les cellules ont été cultivées dans un milieu conçu pour mimer l'environnement cellulaire endométrial durant la période de péri-implantation embryonnaire. Plus précisément, cet environnement contient de la progestérone et de l'IFN- τ (signale la présence de l'embryon chez le bovin). De plus, l'étude a permis une meilleure caractérisation du niveau d'expression des 16 gènes sélectionnés au cours du cycle oestral *in vivo*.

1.1.1 Statut de l'article

Le présent article sera soumis à la revue *Biology of Reproduction*.

1.1.2 Implication de l'auteur dans cet article

La conception des expériences, la production des résultats, ainsi que la rédaction de l'article scientifique ont été réalisées en grande majorité par l'auteur de ce mémoire de maîtrise. Les analyses statistiques ont été faites par M. Steve Méthot, statisticien à

Agriculture et Agroalimentaire Canada. Mesdames Danièle Beaudry, Karine L'Ériger et Marian Mayhue ont contribué sur le plan technique. Ma directrice de recherche, la Dre Marie-France Palin, a chapeauté la conception expérimentale, ainsi que la rédaction de l'article. Les co-auteurs, c'est-à-dire le Dr. Alan Goff, la Dre Hélène Petit, ainsi que mon co-directeur de recherche le Dr. Richard Blouin, ont également contribué sur le plan intellectuel.

1.2 Impact de cet article

La recherche présentée dans cet article s'inscrit dans un domaine de recherche récent et en pleine expansion; la nutriginomique. Les résultats obtenus viennent appuyer l'ensemble des preuves démontrant que la graine de lin est un aliment fonctionnel qui contient des nutriments capable de modifier le niveau d'expression de différents gènes et d'agir sur différentes fonctions cellulaires, telle que la sécrétion des prostaglandines. La présente étude démontre que le ratio d'acides gras oméga-6/oméga-3, ainsi que l'ENL, ont un impact direct sur le niveau d'expression de gènes impliqués dans la survie embryonnaire et sur la sécrétion de prostaglandines de série 2 (PGE₂ et PGF_{2α}) dans les cellules stromales et épithéliales de l'endomètre bovin. Autrement dit, les nutriments se retrouvant dans le sérum des vaches laitières, lorsqu'elles reçoivent une alimentation supplémentée en graine de lin, ont des effets directs sur les cellules endométriales bovines. Les résultats de notre étude apportent donc de nouvelles informations permettant de mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués en début de gestation (jour 17) lorsque la graine de lin est donnée en supplément alimentaire afin d'améliorer la fertilité chez la vache laitière.

Les résultats présentés dans cet article contribuent également à améliorer nos connaissances sur le profil d'expression de plusieurs gènes utérins pendant le cycle

oestral (*in vivo*). Le profil d'expression de ces gènes a également été étudié *in vitro*, sur des cellules endométriales bovines, dans un contexte simulant un début de gestation (progestérone et IFN- τ) et en présence de différents ratios d'acides gras n-6/n-3 et/ou d'ENL. Outre les gènes ayant un rôle connu au moment de la péri-implantation embryonnaire, nous rapportons pour la première fois que les niveaux d'expression du gène *PARMI* sont modulés par la présence de l'IFN- τ , ainsi que par l'addition d'acide gras au ratio LA/ALA de 4 (FA4) dans le milieu de culture de cellules endométriales bovines. Ces résultats suggèrent que le gène *PARMI* pourrait être impliqué dans la survie embryonnaire en début de gestation.

Nos résultats indiquent également qu'un ratio d'acides gras n-6/n-3 plus faible (i.e. FA4 vs FA25) module le niveau d'expression des gènes de manière à favoriser l'implantation embryonnaire. Dans cet article, il est aussi démontré que les acides gras ne sont pas les seuls nutriments de la graine de lin pouvant influencer l'expression des gènes et la sécrétion des prostaglandines au niveau de l'utérus chez la vache laitière. En effet, nous avons observé que l'ENL peut également agir sur l'expression des gènes de cellules endométriales bovines. À notre connaissance, il s'agit de la première évidence scientifique démontrant un effet de l'ENL sur les cellules endométriales bovines.

Nos résultats démontrent pour la première fois que l'ENL diminue la sécrétion des prostaglandines de série 2 par les EC et les SC, ce qui serait favorable à l'implantation embryonnaire. Finalement, nos résultats démontrent que les EC et SC de l'endomètre bovin répondent différemment à la variation du ratio d'acides gras et/ou à la présence d'ENL, suggérant que les mécanismes moléculaires menant à la sécrétion de prostaglandines, ou à l'expression des gènes liés à l'implantation embryonnaire, diffèrent entre ces deux types cellulaires. Dans le cas des EC, la plus importante diminution de PGF_{2 α} est observée lorsque l'ENL et le ratio n-6/n-3 physiologique (FA4) de la graine de lin sont combinés.

Globalement, nos résultats suggèrent qu'il vaut mieux donner la graine de lin entière aux vaches laitières plutôt que seulement les huiles contenant les acides gras ou seulement l'écorce, qui est riche en SDG (lignane végétale, précurseur de l'ENL). Ces résultats pourraient donc aider les producteurs laitiers à mieux orienter leurs décisions en matière de suppléments alimentaires pour améliorer la fertilité de leur troupeau.

Effects of Different Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratios and of Enterolactone on Selected Gene Expression and Prostaglandin Secretion in Dairy Cow Endometrial Cells¹

Catherine Hallé², Alan K. Goff³, Hélène V. Petit⁴, Richard Blouin² and Marie-France Palin^{4*}

¹ This work was financially supported by grant IPDGR 114 from Agriculture and Agri-Food Canada and through a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) studentship granted to C. Hallé.

47

Keywords: endometrium, enterolactone, fatty acids, gene expression, prostaglandins

Summary sentence

Different omega-6/omega-3 (linoleic acid/alpha-linolenic acid) ratios and enterolactone modulate gene expression and prostaglandin secretions with different effects in stromal and epithelial bovine endometrial primary cells.

ABSTRACT

Previous studies have shown that feeding flaxseed to dairy cows can modulate gene expression and prostaglandin secretion in uterus at the time of peri-implantation. The aim of the current study was to determine which flaxseed components, omega-3 fatty acids and/or lignans, are responsible for these effects and how the different endometrial cell types are affected. We evaluated the effects of 6 different omega-6/omega-3 fatty acid ratios (linoleic acid / alpha-linolenic acid) and of enterolactone (ENL) on two primary bovine endometrial cell types, the stromal (SC) and epithelial cells (EC). For each treatment, the mRNA abundance of 16 selected uterine genes with known or suspected roles in embryo survival or prostaglandin secretions was evaluated. Prostaglandin E₂ (PGE₂) and prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) secretions were also measured. Results showed that mRNA abundance of several selected genes was modulated by fatty acid (FA) ratios and/or ENL in different manner depending on the cell type. Decreasing the N-6/N-3 ratio lowered prostaglandin secretions and increased the PGE₂/PGF_{2α} ratio in epithelial cells. The PGE₂/PGF_{2α} ratio was decreased only in EC exposed to alpha-linolenic acid or the omega-6/omega-3 FA ratio of 4 compared to control. Enterolactone decreased prostaglandin secretions in both cell types. In SC, the reduction in prostaglandin secretions was associated with a lower mRNA abundance of the prostaglandin synthase genes *AKR1B1* and *PTGES*. The greatest reduction in PGF_{2α} was observed in cells treated with both the LA/ALA ratio of 4 and ENL. Our results indicate that fatty acids and ENL can modulate the mRNA abundance of genes known or suspected to have key roles in embryo survival and prostaglandin secretions during the

peri-implantation period. Moreover, these modulations vary according to the different cell types.

INTRODUCTION

In ruminants, successful embryo implantation and survival is dependent on efficient recognition of the embryo by the endometrium and the continuous secretion of progesterone (P_4) by the corpus luteum (CL) [1, 2]. In cows, interferon-tau (IFN- τ) is the main antiluteolytic pregnancy recognition signal secreted by the elongating conceptus between days 15 and 28 of gestation [3]. IFN- τ prevents regression of the CL through the suppression of endometrial oxytocin-induced luteolytic pulses of prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) [2, 4]. In cattle, a high proportion of embryonic losses occurring during the establishment of pregnancy is coincident with the period of embryonic inhibition of uterine $PGF_{2\alpha}$ secretion. Therefore, different strategies to further reduce $PGF_{2\alpha}$ synthesis and secretion by endometrial cells may result in increased embryo survival and pregnancy rate. Moreover, it was recently reported that the establishment of pregnancy may also depend on increases in uterine prostaglandin E_2 (PGE_2) secretion, a luteoprotective mediator [5-7]. Consequently, strategies to increase the $PGE_2/PGF_{2\alpha}$ ratio may also contribute to embryo survival.

Prostaglandins (PG) are derivatives of polyunsaturated fatty acids (FA). Arachidonic acid (AA), an omega-6 (N-6) FA, leads to series 2 PG (including $PGF_{2\alpha}$ and PGE_2), whereas eicosapentaenoic acid (EPA), an omega-3 (N-3) FA, leads to series 3 PG [8]. The same elongase and desaturase enzymes can convert the main sources of dietary N-6 FA (linoleic acid (LA)) and N-3 FA (α -linolenic acid (ALA)) to AA and EPA,

respectively [8, 9]. Therefore, competition between N-3 and N-6 FA occurs for PG formation, which may decrease the production of series 2 PG when there is an increased availability of dietary N-3 FA [8]. Indeed, it was demonstrated that N-3 FA can reduce $\text{PGF}_{2\alpha}$ secretion from bovine endometrial cells in vitro [10]. Also, feeding cows with ALA and LA supplements decreased [11], and increased [12], respectively, circulating series 2 PG metabolites in vivo. In addition to the above mentioned effects on elongase and desaturase enzymes, it was earlier reported that N-3 and N-6 FA can modulate gene expression [9]. For example, diets enriched in EPA and docosahexaenoic acid (DHA), both N-3 FA found in fish oil, modulate bovine endometrial gene expression of prostaglandin-endoperoxide synthases (*PGFS*) and prostaglandin E synthase (*PGES*) in a manner that favours establishment and maintenance of pregnancy [13-15].

Flaxseed contains about 55% of total FA in the form of ALA, which is known to have positive effects on fertility. For example, cows fed whole flaxseed have less pregnancy losses and lower plasma concentrations of series 2 PG than cows fed sunflower seed, which is rich in LA [16, 17]. Moreover, cows fed with a flaxseed supplement have higher conception rates and lower embryo mortality when compared to cows fed Megalac (rich in saturated FA) or micronized soybeans (rich in LA) [18, 19].

Apart from its important ALA content, flaxseed is also one of the richest sources of plant lignans. Indeed it contains high amounts of secoisolariciresinol diglucoside (SDG), which is mainly converted within the cows' rumen into the mammalian lignan metabolite enterolactone (ENL) [20]. This lignan is a powerful antioxidant that also acts as a phytoestrogen [21] and thus, could be responsible for some of the reproductive

benefits observed when flaxseed is fed to cows. However, the effects of ENL on reproductive performances have been poorly explored so far.

At the time of peri-implantation the expression of many endometrial genes is modulated to enhance embryo implantation and development [22-24]. To better understand the mechanisms behind the positive effects of flaxseed on dairy cows fertility, we first performed a transcriptomic study comparing endometrial tissue transcripts of dairy cows fed a supplement of 10% whole flaxseed vs those fed a control diet [25, 26]. Tissues were collected on day 17 of pregnancy, which corresponds to the peri-implantation period. Among all differentially expressed uterine transcripts, genes involved in PG synthesis such as prostaglandin E synthase (*PTGES*) and aldo-keto reductase family 1, member B1 (*AKR1B1*, a PGF synthase) were identified. Genes known to be regulated by IFN- τ were also identified (ex. 2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa (*OAS1*) [27] and ISG15 ubiquitin-like modifier (*ISG15*)) [28] along with genes known or suspected to have a critical role in embryo survival (e.g. dickkopf homolog 1 (*DKK1*) [29] and zinc finger protein 36, C3H type-like 1 (*ZFP36L1*) [30]. As flaxseed was fed to cows in all these previous experiments, it was impossible to determine whether differences in gene expression were due to the presence of N-3 FA, ENL or both in the diet. Moreover, these studies provided information on gene expression levels in the whole endometrium with no distinction between cell types. Therefore, the current in vitro study was undertaken to identify the effects of omega-3 FA (ALA), omega 6 FA (LA) and ENL on two bovine endometrial cell types, the stromal (SC) and epithelial cells (EC). More precisely, our objectives were to determine the effects of different LA/ALA ratios and of ENL on the mRNA abundance of selected genes and PGE₂ and PGF_{2 α} secretions in

bovine endometrial primary cell culture. Also, to characterize further the expression profile of selected genes in bovine endometrial tissue, we assessed the *in vivo* mRNA abundance throughout the estrous cycle.

MATERIALS AND METHODS

Endometrial Tissue Collection Throughout the Estrous Cycle

Endometrial tissue was collected from the middle section of the ipsilateral and contralateral horns of multiparous Holstein cows at the local slaughterhouse [31]. Animals were selected based on healthy and normal appearance of the reproductive tract and the macroscopic examination of ovaries [32, 33]. Tissue samples were obtained from 3-4 animals per estrous cycle stage. Estrous cycle stages were determined as described in Ireland et al. [32]: stage 1 (days 1-4), n = 3; stage 2 (days 5-10) n = 3, stage 3 (days 11-17) n = 3, stage 4 (days 18-21) n = 4. Endometrial tissue samples were immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until used.

Endometrial Primary Cell Isolation and Culture

Uteri were collected from multiparous Holstein cows at stage one of the estrous cycle (days 1-4) at the local slaughterhouse and transported on ice to the laboratory. Uteri were selected based on their healthy and normal appearance and the presence of a corpus hemorrhagicum and a degraded CL from previous cycle on the ovaries [32, 33]. Endometrial epithelial (EC) and stromal cells (SC) were isolated using methods described in Fortier et al. [34] and Xiao and Goff [35] with the following modifications. The cervix was removed and both horns were rinsed in sterile PBS (1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100

mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄ - pH 7.4). The myometrium was removed by dissection and the uterine horns were carefully inverted with a long hook to expose the epithelium. Each horn was then cut into 4-5 sections that were each tied up at both ends. The tissue was then digested for 1 h 30 min at 37°C in Hanks Buffer Saline Solution without calcium and magnesium (HBSS) (Invitrogen, Grand Island, NY), supplemented with 0.3% (v/v) trypsin (Invitrogen) and an antibiotic-antimycotic 1X solution (ABAM) (Invitrogen), to collect luminal epithelial cells (LEC). This was followed by a second digestion for 1 h 15 min at 37°C in a new HBSS solution containing 0.06% (v/v) trypsin, 0.06% (w/v) collagenase type 1 (Invitrogen) and ABAM to collect SC and glandular epithelial cells (GEC). After each digestion, the horns' sections were rubbed lightly with the non cutting edge of a cell lifter and rinsed twice in HBSS to free the cells. Right after the LEC suspension (first digestion) and the SC and GEC suspension (second digestion) were obtained, 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen) was added to inhibit trypsin activity. To purify LEC from contaminating SC, the LEC suspension was centrifuged at 200 × g for at least 7 min to collect the LEC cell clumps. The LEC pellets were washed 3 times with HBSS, pooled and then suspended in 30 ml of culture medium: RPMI-1640 with L-Glutamine and 25 mM HEPES (Invitrogen) supplemented with 10% v/v FBS and 100µg/mL primocin (InvivoGen, San Diego, CA). To increase EC total yield, the SC and GEC suspension was filtrated through a 40 µm BD Falcon cell strainer (BD Biosciences, Bedford, MA). GEC clumps were recovered by backwashing the strainer with HBSS to obtain GEC, whereas the SC passed through the strainer. The GEC suspension was then centrifuged at 200 × g for 5 min. The pellets were washed 1-2 times with HBSS, pooled and then suspended in 20 ml culture medium. In order to eliminate

remaining contaminating SC from EC, the LEC and the GEC were plated in 92 mm × 16 mm Petri dishes (10 ml per dish) and incubated at 37°C with 5% CO₂ for 3 h. The culture media containing the floating EC clumps were then delicately collected, thus leaving the contaminating SC adhered to the dish. The filtrated SC suspension was centrifuged at 60 × g for 5 min to further eliminate contaminating EC and the supernatant was then centrifuged at 1000 × g for 10 min to recover SC. The SC pellets were then resuspended in 4 ml erythrocyte lysis buffer (154 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA) [36] for 7 min at room temperature and centrifuged at 1000 × g for 5 min. The SC pellets were washed twice in HBSS, pooled and suspended in 20 ml culture medium.

Cell counts were obtained by trypan-blue staining (Biowhittaker, Walkersville, MD) for the three purified cell types. The SC were plated in Costar 6-well TC-Treated plates (Corning, Corning, NY) at 5×10^5 viable cells per well. Three hours after SC plating, the culture media were changed to get rid of remaining contaminating EC clumps. The LEC and GEC were pooled and plated in Corning CellBIND 6-well plates (Corning) at a minimum of 4.5×10^5 viable cells per well. Both SC and EC were cultured at 37°C with 5% CO₂ until 95-100% confluence (6-8 days) in 2 ml culture medium supplemented with 10 ng/ml P₄ (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) except for the control (CO). For the first 3 days of EC culture, FBS concentration was increased to 20% (v/v). The culture medium was changed every 2-3 days. The purity of cell cultures was determined using an inverted microscope, the cell morphology between SC and EC being distinctive. At the end of cell treatments, the averaged SC and EC purity was estimated to be 97% and 95%, respectively.

Cell viability test

To determine whether the different treatments used in cell culture could affect endometrial cell viability, preliminary experiments were conducted. Treatments of cell with ENL, recombinant ovine interferon-tau (roIFN- τ), or P₄ had no effect on endometrial cell viability. However, when using a total FA concentration of 100 μ M for the different LA/ALA ratios studied (Table 1), cytotoxicity was observed in SC for all ratios that contained ALA, whereas in EC, decreased cell viability was observed in the LA/ALA ratio of 25 and ∞ . Therefore, to avoid FA cell toxicity, preliminary trials were conducted in order to determine the optimal total FA concentration to be used in cell cultures. Concentrations of 0 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M and 100 μ M of ALA were first tested in duplicate on confluent SC. Cytotoxicity was estimated after a 24 h period of exposition to FA. For both cell types, cell death was evaluated visually under an inverted microscope using crystal violet staining. For SC, cell viability was decreased in wells that were exposed to ALA concentrations \geq 30 μ M, whereas wells containing ALA concentrations of 1 μ M, 10 μ M and 20 μ M had no effect on cell death. For EC, there was no cell death in wells containing FA concentrations \leq 50 μ M whatever the LA/ALA ratio was. Consequently, a concentration of 20 μ M total FA was chosen for both cell types.

TABLE 1. Description of experimental treatments used on primary bovine endometrial cell cultures.

Treatments ^a	Final concentrations		
	LA	ALA	ENL
CO	-	-	-
COP	-	-	-
COPI	-	-	-
FA ratio 0 (FA0)	-	20 μ M	-
FA ratio 1 (FA1)	10 μ M	10 μ M	-
FA ratio 4 (FA4)	16 μ M	4 μ M	-
FA ratio 15 (FA15)	18.75 μ M	1.25 μ M	-
FA ratio 25 (FA25)	19.23 μ M	0.77 μ M	-
FA ratio ∞ (FA ∞)	20 μ M	-	-
ENL 1 (E1)	-	-	1 μ M
ENL 10 (E10)	-	-	10 μ M
ENL 1 + FA4 (E1FA)	16 μ M	4 μ M	1 μ M
ENL 10 + FA4 (E10FA)	16 μ M	4 μ M	10 μ M

^a CO, Control; COP, Control with 10 ng/ml progesterone; COPI, Control with 10 ng/ml progesterone and 45 ng/ml roIFN- τ (used to compare results); FA, Fatty acids; ENL, Enterolactone; LA, linoleic acid (N-6); ALA, alpha-linolenic acid (N-3). The FA ratios represent the N-6/N-3 ratio (LA/ALA). All FA and ENL treatments contained 10 ng/ml progesterone and 45 ng/ml roIFN- τ .

Product Preparation for Cell Treatments

Linoleic acid (LA) and α -linolenic acid (ALA) were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Six FA solutions, each having a different LA/ALA (N-6/N-3) ratio (Table 1), were prepared at a 20 mM total FA concentration. Fatty acids were dissolved in pure ethanol purged with nitrogen and kept in darkness under nitrogen atmosphere at 4°C. For ENL (Sigma-Aldrich), two stock solutions of 1 mM and 10 mM were prepared using pure ethanol purged with nitrogen. These solutions were kept under nitrogen atmosphere and at 4°C. For progesterone, a 20 μ g/ml stock solution was prepared in culture medium and darkness. Finally, a 180 μ g/ml of roIFN- τ (RayBiotech, Norcross, GA) stock solution was prepared on ice according to the manufacturer's instructions. It was earlier demonstrated that bovine endometrial cells show similar responses to roIFN- τ and recombinant bovine IFN- τ [37]. The P₄ and roIFN- τ were used to mimic the day-17 gestational situation of dairy cows [3, 5].

Endometrial Primary Cell Treatments

Upon reaching confluence, the culture medium was removed and each well rinsed twice with 1 ml HBSS. The cells were then incubated for 24 h at 37°C with 5% CO₂ in 2 ml of a freshly prepared RPMI-1640 culture medium without FBS [10] that contained 100 μ g/ml Primocin, a final concentration of 0.2% ethanol (v/v), 10 ng/ml of P₄ [3, 38] (except for Control (CO)) and the appropriate treatment (Table 1). The LA/ALA ratios of 4, 15 and 25 were chosen because they correspond to physiological serum concentrations found in dairy cows fed 10% flaxseed (rich in ALA) in the diet (dry matter basis), Megalac/normal control diet or 10% sunflower seed (rich in LA) in the diet, respectively

[11, 17]. The 1 μ M ENL treatment corresponds to the physiological ENL concentration found in serum of dairy cows receiving flax hulls and oil [20]. Culture medium was then removed and each well was rinsed twice with 1 ml HBSS. Cells were incubated for an additional 24 h in 2 ml of a freshly prepared RPMI-1640 culture medium without FBS, containing 100 μ g/ml primocin, 10 ng/ml P_4 (except for CO) and 45 ng/ml of roIFN- τ [39] (except for CO and control with P_4 (COP)). Progesterone and interferon- τ were added to the cell culture media in order to mimic pregnancy hormonal conditions of the peri-implantation period. At the end of roIFN- τ incubation, culture medium was immediately collected from each well to measure PGE_2 and $PGF_{2\alpha}$ concentrations. Total RNA and proteins were extracted from cells using the Nucleospin RNA/Protein kit (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA) according to the manufacturer's instructions. For both cell types, each treatment was repeated twice using cells from four different cows. As CO and COP treatments were prepared only to confirm the efficiency of P_4 and roINF- τ in our cell culture system, the control with progesterone and interferon- τ (COPI) was the reference used to compare treatments and analyze results.

Prostaglandins Concentration in Culture Media

For both cell types, $PGF_{2\alpha}$ and PGE_2 concentrations were measured in culture medium from each treatment using $PGF_{2\alpha}$ and PGE_2 Enzyme Immunoassays (EIA) kits (Assay Designs, Ann Arbor, MI) following the manufacturer's instructions. Culture media obtained from duplicates were pooled for each treatment. Intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) were 3.74% and 6.21% for $PGF_{2\alpha}$ and 4.12% and 5.12% for PGE_2 , respectively. The $PGE_2/PGF_{2\alpha}$ ratio was also measured for each treatment.

Real-Time Polymerase Chain Reaction Analyses of Selected Genes

For each sample of endometrial tissue collected throughout the estrous cycle, total RNA was extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's indications. For endometrial tissue and for SC and EC cell cultures, reverse transcription of extracted RNA and real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analyses of selected genes were performed as described in Farmer et al. [40]. The stanniocalcin 1 (*STC1*) gene was used to validate the different estrous cycle stages [3, 41]. The cDNA samples obtained from duplicated cell treatments were pooled. Amplification of bovine selected genes and reference genes (RG) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), peptidylpropyl isomerase A (*PPIA*) and polyubiquitine was performed using bovine specific primer sequences (Table 2). Genes were selected from a previous study where dairy cows' endometrial tissue transcripts were hybridized to a two-species cDNA microarray. This microarray was developed in our laboratory for profiling sow and dairy cow transcripts believed to be associated with embryo survival during the peri-implantation period [25, 26]. The endometrial tissue samples of that previous study were collected on day 17 of pregnancy from dairy cows fed a control diet or a diet supplemented with 10% flaxseed, thus resulting in in vivo gene modulation by a diet rich in N-3 FA and lignans.

TABLE 2. Primer sequences used for quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analyses.

Genes ^a	Primer sequences 5'-3' ^b	Fragment size (bp)	Genbank Accession Number
<i>GAPDH</i>	F: GACCCCTTCATTGACCTTCA R: AACTTGCCGTGGGTGGAAT	66	BTU85042
<i>PPLA</i>	F: GAGCACTGGAGAGAAAGGATTG R: GGCACATAAATCCCGGAATTATT	71	AF228021
<i>Polyubiquitin</i>	F: TGGAGCCCAGTGACACCAT R: GGCCATCTTCCAGCTGCTT	111	NM_174133
<i>AKR1B1</i>	F: ACCTGGACCTCTACCTCATCCA R: CCTCATCCAATGGGAAGAAGTC	72	NM_001012519
<i>ANXA2</i>	F: AGCCCCTGTATTTTGCTGACA R: TGC GCGAGACCATGATTCTA	90	NM_174716
<i>CTGF</i>	F: GAAGCTGACCTGGAGGAGAACA R: TGCAGCCAGAAAGCTCAAACCT	94	BC113279
<i>CXCL10</i>	F: TTGCCACAATGAAAAAGAATGG R: CCTTTGCTTGTTAATTGCTTTCAG	92	BC112547
<i>CYP39A1</i>	F: GCTGGCTCTGTTGGAGATTCA R: CCACCAAGTGGAGAGAACTCTGT	104	BC146085
<i>DKK1</i>	F: TGTGTTGTGCTAGACATTTCTGGTC R: TGTGCTTGGTGCACACTTGAC	75	XM_580572
<i>FOS</i>	F: CTGAGCCCTTGTATGACTACATGT R: AGGAACCAGACAGGTCCATGTC	96	AY322482
<i>GJA1</i>	F: GCTCCTCTCTCGCCCATGT R: TTTGCTCACTTGCTTGTTTGTG	100	BC105464
<i>IFIT3</i>	F: GGGTCGAGAAGCTCTCTGAGTATAGA R: GCGTGAAGAAGGCAGTGAGG	69	DW183548
<i>IRF6</i>	F: TCTGGTGACTTCACACGATCCT R: CAGCTGAGCAACGATGTTATCC	90	BC123806
<i>ISG15</i>	F: AGGGAGGCCCATGGATGA R: CACCCCGAAGACGTAGATTCA	89	NM_174366
<i>OAS1</i>	F: TCACAGCTCAGGGATTTTCAGACT R: TCTTTTCCCAGTAGATGCAAAGC	75	AY243505
<i>PARM1</i>	F: CAGAATGGGCTTCAACCTTGAT R: ATCACGCCTGCCTAAGAAATGA	93	DW183724
<i>PTGES</i>	F: AGACCATCTACCCCTTCCTGTTT R: GCCACGGTGTGTACCATACG	118	NM_174443
<i>STC1</i>	F: ACATGGCCAGCCTCTTTTAC R: CAGCTTCTGTGGCTCATTGG	101	BC105435
<i>TGFβ1</i>	F: TGCTTCAGCTCCACAGAAAAGA R: GGCAGAAATTGGCGTGGTA	115	NM_001166068
<i>ZFP36L1</i>	F: AATTTCCCCCTTTGTGTTGG R: CATTCTCAGTCCTAGTTGTGAAAGGC	75	NM_001101234

^a *GAPDH*, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *PPLA*, Peptidylprolyl isomerase A; *AKR1B1*, Aldo-keto reductase family 1, member B1; *ANXA2*, Annexin A2; *CTGF*, Connective tissue growth factor; *CXCL10*, Chemokine (C-X-C motif) ligand 10; *CYP39A1*, Cytochrome P450, family 39, subfamily A, polypeptide 1; *DKK1*, Dickkopf homolog 1; *FOS*, FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog; *GJA1*, Gap junction protein, alpha 1, 43kDa; *IFIT3*, Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3; *IRF6*, Interferon regulatory factor 6; *ISG15*, ISG15 ubiquitin-like modifier; *OAS1*, 2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa; *PARM1*, Prostate androgen-regulated mucin-like protein 1; *PTGES*, Prostaglandin E synthase; *STC1*, Stanniocalcin 1; *TGFβ1*, Transforming growth factor, beta 1; *ZFP36L1*, Zinc finger protein 36, C3H type-like 1.

^b F, Forward; R, Reverse.

The PCR amplifications were performed in triplicate, and standard curves were established in duplicate for each gene. Standard curves were composed of serial dilutions of complementary DNA pools from the same tissue or cell types (e.g. endometrial tissue, SC or EC) and were used to obtain the relative mRNA abundance of selected genes using the standard curve method as described by Applied BioSystems (Applied Biosystems, Foster City, CA) [42]. Selection of the best RG for normalization was made according to the geNorm software (<http://medgen.ugent.be/genorm/>), which finds the optimum reference genes out of a group of candidate genes [43]. Polyubiquitine was chosen as the RG for endometrial tissue samples collected during the estrous cycle. For both EC and SC cultures, the normalisation factor was calculated with the geometric mean of all three RG. This normalisation factor was then used as a RG. Selected genes and RG amplifications were run in separate assays. For each experimental sample, the abundance of selected genes mRNA relative to RG mRNA abundance was determined from the corresponding standard curves. Mean values were calculated from triplicate amplifications and relative quantity ratios were then obtained by dividing the relative quantity unit of selected genes by those of RG. These values were used to perform statistical analyses.

Statistical Analysis

The relative mRNA abundance of selected genes in endometrial tissue collected throughout the estrous cycle was analyzed using the MIXED procedure of SAS (SAS Institute Inc. 2002) in a one-way ANOVA with unequal variances testing the effect of estrous cycle stage. A confirmatory Kruskal-Wallis test (non parametric analysis) was

also obtained for these data. The relative mRNA abundance data collected from SC and EC culture experiments were first analyzed globally for all treatments using a one-way ANOVA followed by multiple comparisons of all treatments to the COPI control treatment with a Dunnett adjustment. Then, a separate analysis for the effect of the different FA ratios on relative mRNA abundance of selected genes was performed using a one-way ANOVA followed by an all pair-wise multiple comparison with a Tukey correction. The relative mRNA abundance of selected genes in primary cell cultures treated with ENL were also separately analyzed according to a 3 x 2 factorial arrangement with ENL (0 μ M, 1 μ M or 10 μ M) and FA (no added FA or 20 μ M FA of ratio 4) concentrations as the main effects. The baseline (COPI) of prostaglandin concentrations varied considerably between the different cell culture experiments but similar responses to treatments were observed among the four cows. Therefore, prostaglandins data were analyzed using a Friedman's test on rank transformed data with the same three steps as those described above for relative mRNA abundance data. Finally, to demonstrate that treatments with P₄ and roIFN- τ had a real effect on endometrial cells, the relative mRNA abundance data for the CO, COP and COPI treatments were analyzed separately using a one-way ANOVA, followed by an all pair-wise multiple comparison with a Tukey correction. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$ and tendencies at $0.05 < P \leq 0.1$.

RESULTS

mRNA Abundance of Selected Genes Throughout the Estrous Cycle

All selected genes were detected in cow's endometrial tissue throughout the estrous cycle. Results show that mRNA abundance of selected genes seems to vary in a similar way across the estrous cycle in the ipsilateral and contralateral horns of uterus. There were no significant differences in relative mRNA abundance of the connective tissue growth factor (*CTGF*), chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (*CXCL10*), cytochrome P450, family 39, subfamily A, polypeptide 1 (*CYP39A1*), FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (*FOS*), interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (*IFIT3*), *ISG15*, *OAS1*, prostate androgen-regulated mucin-like protein 1 (*PARM1*) and *ZFP36L1* genes between the different estrous cycle stages (data not shown). Significant differences in mRNA abundance are presented in figure 1. In the contralateral horn, significant differences in relative *AKR1B1* mRNA levels were observed between stages 2 and 4 ($P < 0.01$) of the estrous cycle. The annexin A2 (*ANXA2*) mRNA abundance was higher in endometrial tissues collected at stage 1 than at stage 3 (ipsilateral horn: $P < 0.01$; contralateral horn: $0.05 < P < 0.1$). In ipsilateral horns, the relative mRNA abundance of *DKK1* was higher in stages 2 and 3 when compared with stages 1 and 4 of the estrous cycle (stages 1 vs 2 and 2 vs 4: $0.05 < P < 0.1$; stages 3 vs 1 and 3 vs 4: $P < 0.001$). The same expression profile was observed in the contralateral horns for *DKK1* (stages 1 vs 2 and 2 vs 4: $P < 0.01$; stages 3 vs 1 and 3 vs 4: $P < 0.05$). There was less gap junction protein, alpha 1, 43kDa (*GJA1*) mRNA in stages 2 and 3 compared to stage 4 in the ipsilateral horn (stages 2 vs 4, $P < 0.01$; stages 3 vs 4, $P < 0.05$). For interferon regulatory factor 6 (*IRF6*), its relative mRNA abundance was higher in stage 2 than 1 for

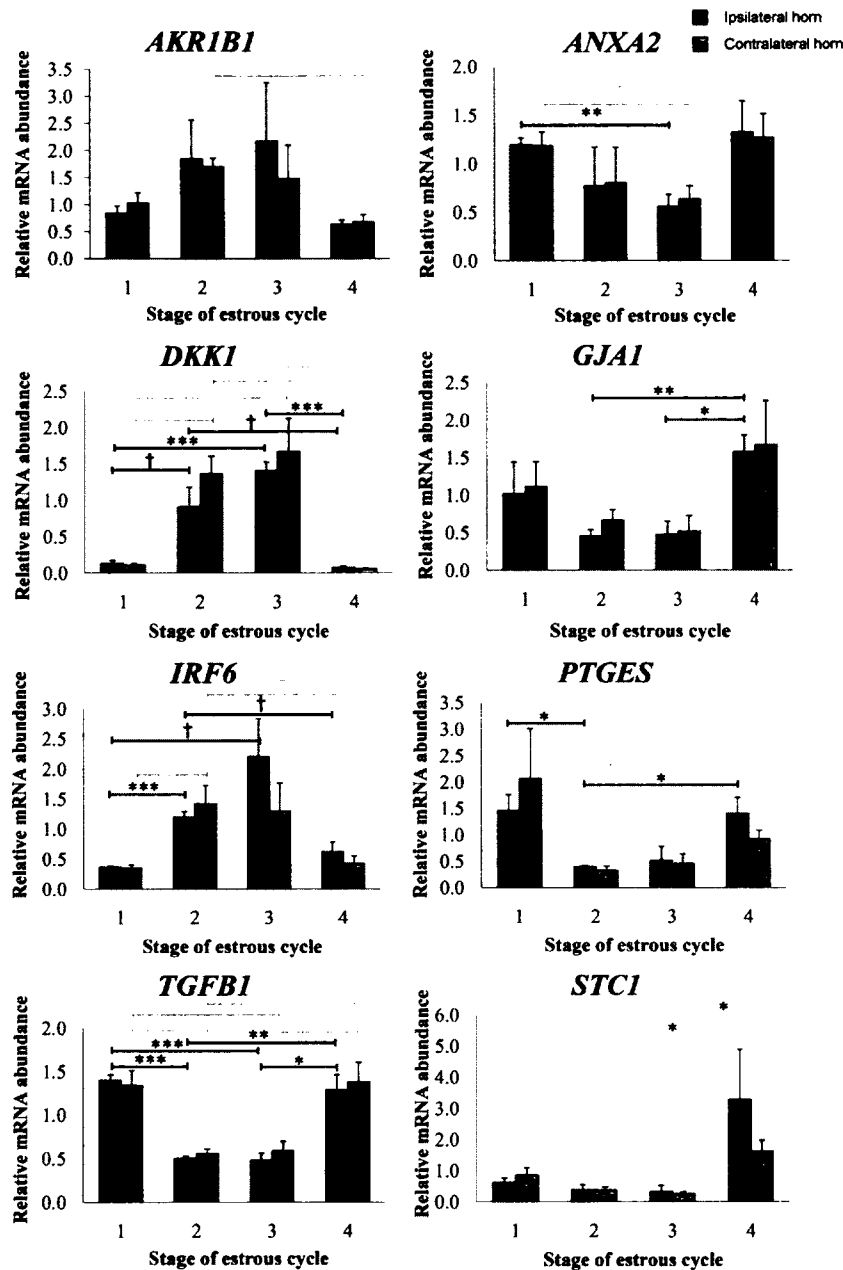


FIG. 1. Relative mRNA abundance of selected genes in dairy cows endometrium throughout the estrous cycle. Genes with significant differences for relative mRNA abundance between the four stages are presented. Stage 1 corresponds to days 1 to 4 of the cycle; stage 2 to days 5 to 10; stage 3 to days 11 to 17; and stage 4 to days 18 to 21. Results represent relative mRNA abundance mean values \pm SEM of 3-4 animals per stage, performed in triplicates. Polyubiquitine was used as the reference gene. *AKR1B1*, Aldo-keto reductase family 1, member B1; *ANXA2*, Annexin A2; *DKK1*, Dickkopf homolog 1 (DKK1); *GJA1*, Gap junction protein, alpha 1, 43kDa; *IRF6*, Interferon regulatory factor 6; *PTGES*, Prostaglandin E synthase; *TGFβ1*, Transforming growth factor, beta 1; *STC1*, Stanniocalcin 1 (used as a control to confirm estrous cycle stage). † $0.05 \leq P < 0.1$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

both horns (ipsilateral: $P < 0.001$; contralateral: $P < 0.05$). Moreover, in the ipsilateral horn, higher levels of *IRF6* mRNA were observed in stage 3 endometrial tissue when compared with stage 1 ($0.05 < P < 0.1$), whereas in both horns, stage 2 mRNA levels were higher than in stage 4 ($0.05 < P < 0.1$). The mRNA abundance of *PTGES* was lower in stage 2 compared to stages 1 and 4 in the ipsilateral horn ($P < 0.05$) and, in the contralateral horn, stage 2 *PTGES* mRNA levels were lower ($0.05 < P < 0.1$) than in stage 4 endometrium. There were less transforming growth factor, beta 1 (*TGFβ1*) mRNA levels in stages 2 and 3 compared to stages 1 and 4 in both horns ($P < 0.05$). Finally, *STC1* mRNA abundance was higher in stage 4 than in stages 2 and 3 in the contralateral horn ($P < 0.05$).

Validation of the Endometrial Cell Culture System

To validate our cell culture system, the relative mRNA abundance of selected genes was first assessed in cells treated with P_4 (COP), P_4 and roIFN- τ (COPI) or no hormone (CO). These treatments had no effect on *AKR1B1*, *CTGF*, *CYP39A1*, *FOS*, *GJA1*, *IRF6* and *PTGES* gene expression in neither stromal nor epithelial cells (data not shown). In epithelial cells, *CXCL10* and *DKK-1* transcript levels were below detection limit as measured with the RT-qPCR technique. Significant results are shown in Figure 2. In stromal cells, significant increases in relative mRNA abundance were observed for *CXCL10* ($P < 0.05$), *IFIT3* and *OAS1* ($P < 0.01$), *ISG15* ($P < 0.001$) and *PARM1* ($P < 0.001$) genes in the COPI treatment when compared with the CO and COP treatments (Fig. 2A). There was a significant increase in relative mRNA abundance for *ANXA2* ($P < 0.05$) in the COPI treatment compared to COP treatment. Moreover, there was a tendency

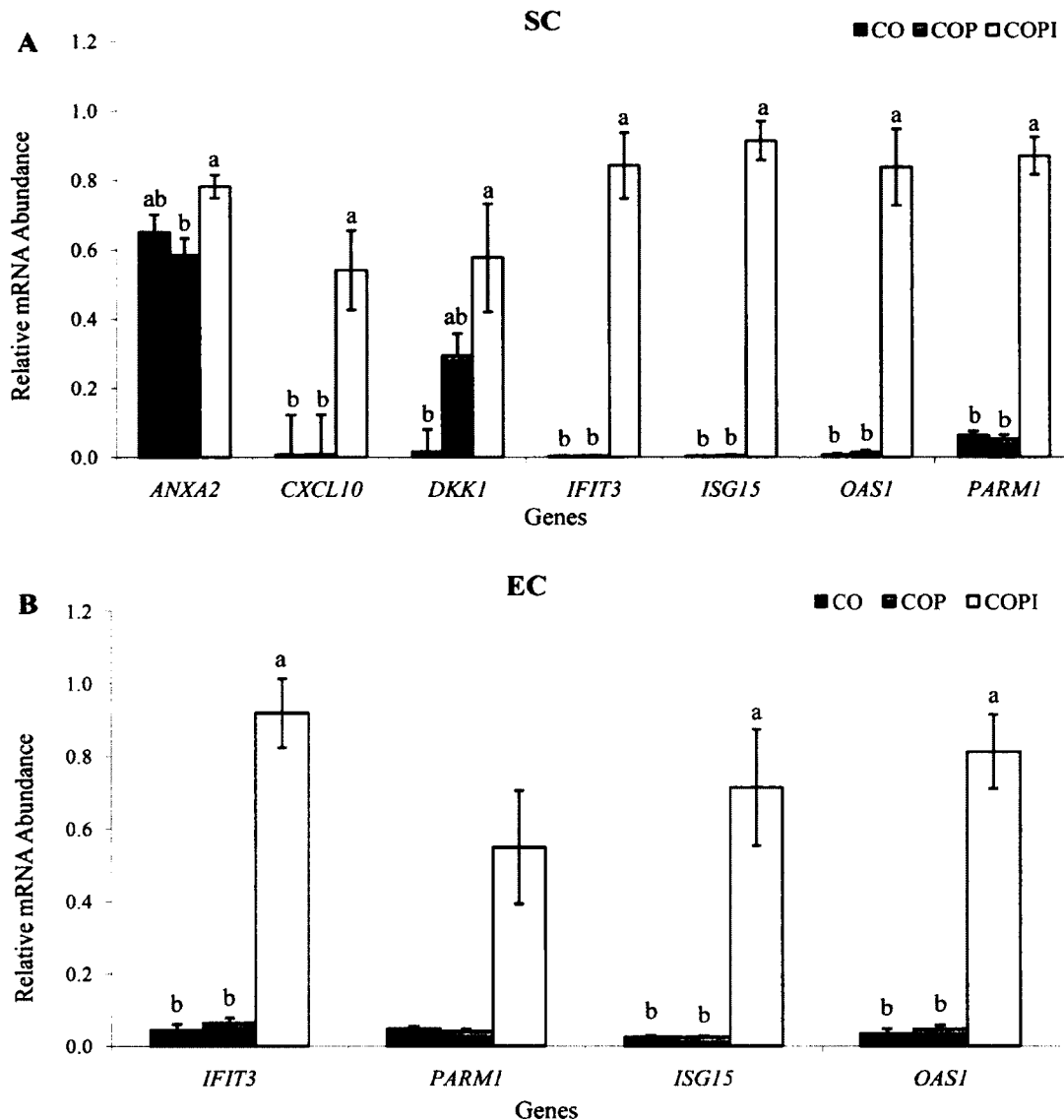


FIG. 2. Relative mRNA abundance of selected genes in primary endometrial cell cultures treated with progesterone and roIFN- τ . Genes with significant differences or tendencies in relative mRNA abundance between the three treatments are presented. Data represents relative mRNA abundance mean values \pm SEM of four cell culture experiments performed in triplicates. For each gene, means with a different superscript differ at $P \leq 0.05$. The mean of all three reference genes: polyubiquitine, *GAPDH* and *PPIA*, was used for normalisation. Treatments were CO, control without progesterone and without roIFN- τ ; COP, control with progesterone; COPI, control with progesterone and roIFN- τ . *ANXA2*, Annexin A2; *CXCL10*, Chemokine (C-X-C motif) ligand 10; *DKK1*, Dickkopf homolog 1 (DKK1); *IFIT3*, Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3; *ISG15*, ISG15 ubiquitin-like modifier; *OAS1*, 2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa.; *PARM1*, Prostate androgen-regulated mucin-like protein 1. A) SC, stromal cells; B) EC, epithelial cells.

for an increase in *DKK1* relative mRNA abundance with addition of P_4 in cell culture media (COP vs CO: $0.05 < P < 0.1$), whereas addition of both P_4 and roIFN- τ further increased mRNA abundance (COPI vs CO: $P < 0.05$). In epithelial cells, there was a significant increase in mRNA abundance of *ISG15* ($P < 0.05$), *IFIT3* and *OAS1* ($P < 0.01$), and *PARM1* ($0.05 < P < 0.1$) genes for COPI treated cells compared with CO and COP treatments (Fig. 2B).

Relative mRNA Abundance of Selected Genes in Stromal and Epithelial Cell Cultures

When we performed a global analysis of relative mRNA abundance data of all treatments containing P_4 and roIFN- τ , there was a trend ($0.05 < P < 0.1$) for an overall treatment effect for the *IFIT3* gene in SC only. Multiple comparisons with the COPI treatment then revealed that treating SC with 10 μ M ENL (E10) decreases *IFIT3* mRNA abundance when compared with the COPI treatment ($P < 0.05$; data not shown).

Analysis of the effects of the different FA ratios on relative mRNA abundance of selected genes were performed separately. The all pair-wise multiple comparisons are presented in Figure 3 for genes that were significantly affected by the different FA ratios. In SC (Fig. 3A), the global analysis of all FA ratios revealed a significant treatment effect for *CXCL10* and *IFIT3* ($P < 0.05$) and a tendency for *FOS* and *CYP39A1* ($0.05 < P < 0.1$) transcripts abundance. The all pair-wise multiple comparisons then revealed that *FOS* relative mRNA abundance was the highest when cells were treated with the LA/ALA ratio of 15 (FA15) and significant differences were observed when compared with the FA0, FA1 and FA25 treatments (Fig. 3A, $P < 0.05$).

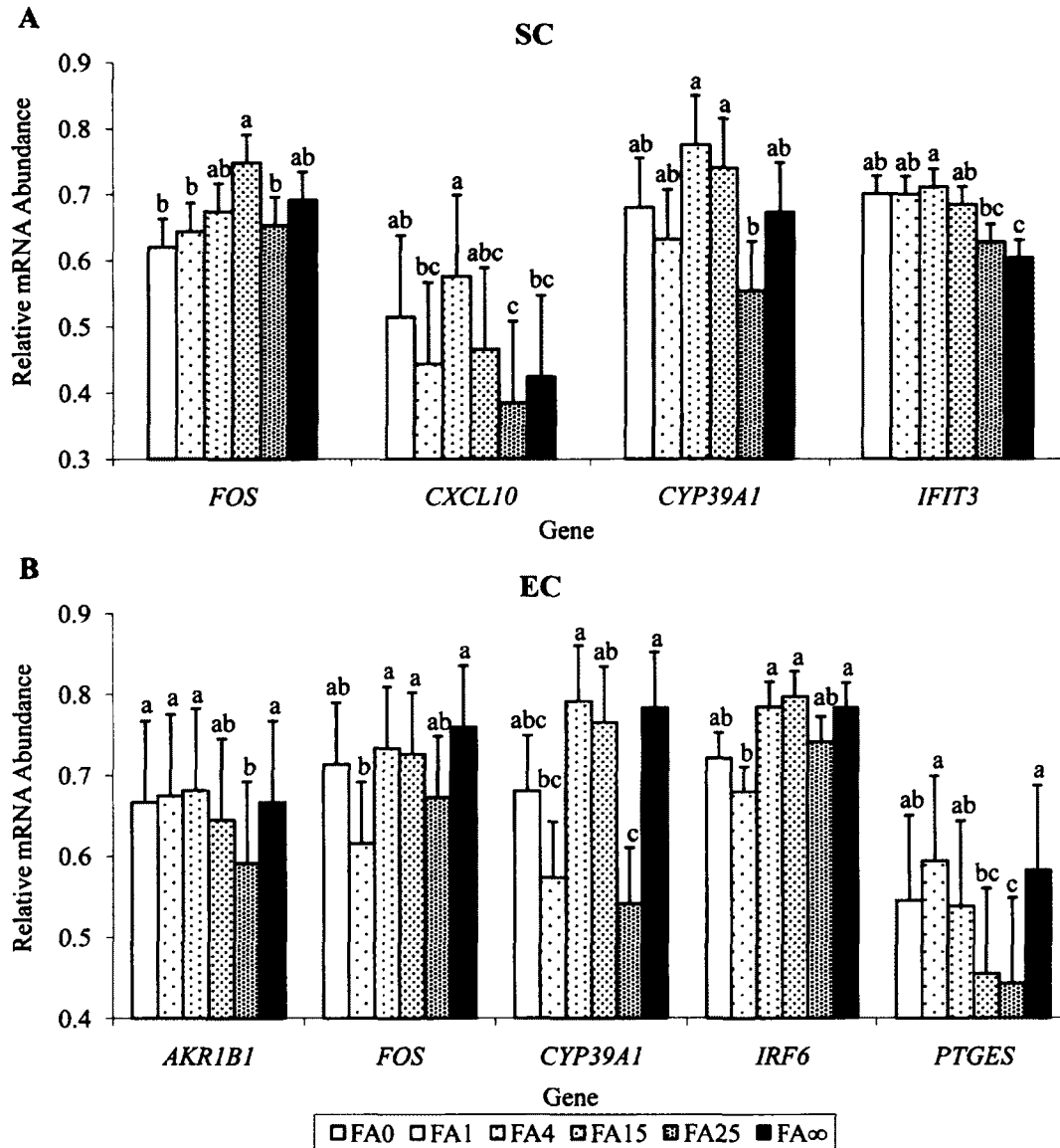


FIG. 3. Relative mRNA abundance of selected genes in primary endometrial cell cultures treated with different fatty acid ratios (LA/ALA). Genes with significant overall differences or tendencies for relative mRNA abundance between the six treatments are presented. In SC, a global analysis of all FA ratios reveals a significant treatment effect on *CXCL10* and *IFIT3* ($P < 0.05$) and a tendency for *FOS* and *CYP39A1* ($0.05 < P < 0.1$) transcripts abundance. In EC, there was a significant overall effect of the different LA/ALA ratios on *PTGES* mRNA abundance ($P < 0.05$) and tendencies were observed for *AKR1B1*, *FOS*, *CYP39A1* and *IRF6* genes ($0.05 < P < 0.1$). Data represents the relative mRNA abundance mean values \pm SEM of four cell culture experiments performed in triplicates. For each gene, means with a different superscript differ at $P \leq 0.05$. The mean of all three reference genes: polyubiquitine, *GAPDH* and *PPIA*, was used for normalisation. Treatments were FA0, 20 μ M ALA; FA1, 10 μ M LA + 10 μ M ALA; FA4, 16 μ M LA + 4 μ M ALA, FA15, 18.75 μ M LA + 1.25 μ M ALA; FA25, 19.23 μ M LA + 0.77 μ M ALA; FA ∞ , 20 μ M LA. *FOS*, FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog; *CXCL10*, Chemokine (C-X-C motif) ligand 10; *CYP39A1*, Cytochrome P450, family 39, subfamily A, polypeptide 1; *IFIT3*, Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3; *AKR1B1*, Aldo-keto reductase family 1, member B1; *IRF6*, Interferon regulatory factor 6; *PTGES*, Prostaglandin E synthase. A) SC, stromal cells; B) EC, epithelial cells.

The *CXCL10* and *CYP39A1* genes responded similarly to the addition of the different FA ratios, thus showing similar mRNA abundance profiles. Indeed, the highest and lowest mRNA level of *CXCL10* and *CYP39A1* genes was observed, respectively, with FA4 and FA25 ($P < 0.05$). The *IFIT3* mRNA abundance decreased with increasing LA/ALA ratios and the lowest mRNA abundance was observed with FA ∞ , which was different from the FA0, FA1, FA4 and FA15 treatments ($P < 0.05$).

In epithelial cells (Fig. 3B), there was an overall effect of the different LA/ALA ratios on *PTGES* mRNA abundance ($P < 0.05$) and tendencies were observed for *AKR1B1*, *FOS*, *CYP39A1* and *IRF6* genes ($0.05 < P < 0.1$). The *AKR1B1* and *PTGES* gene expression profiles responded similarly to the different FA ratios. Indeed, these two genes had the lowest mRNA abundance when cells were treated with FA25, which was significantly different from the mRNA abundance observed with FA0, FA1, FA4 and FA ∞ ($P < 0.05$). For *PTGES*, mRNA abundance obtained with FA15 was lower than that observed with FA1 and FA ∞ ($P < 0.05$). The *CYP39A1* mRNA abundance was lower in cells receiving the FA25 treatment when compared with FA4, FA15 and FA ∞ ($P < 0.05$). Lower *CYP39A1* mRNA abundance was also observed with FA1 when compared with the mRNA abundance observed with FA4 and FA ∞ ($P < 0.05$). On the other hand, the *FOS* and *IRF6* lowest mRNA abundance was found in cells receiving the FA1 treatment, which was significantly different from FA4, FA15 and FA ∞ ($P < 0.05$).

The relative mRNA abundance of selected genes in primary cell cultures treated with ENL was also analyzed separately according to a 3 x 2 factorial arrangement of treatments and significant results are presented in Table 3. In stromal cells, the presence of ENL significantly decreased the mRNA abundance of *AKR1B1*, *DKK1*, *IFIT3*, *IRF6*,

PTGES and *ZFP36L1* genes and tended to reduce mRNA abundance of *OAS1* and *TGFβ1*. Regardless of the presence or absence of FA in cell culture media, stromal cells that were grown with 10 μM ENL had lower mRNA abundance than those receiving 0 μM ENL for the following genes: *AKR1B1* (0.474 vs 0.544, $P < 0.05$), *DKK1* (0.430 vs 0.584, $P < 0.05$), *ZFP36L1* (0.502 vs 0.668, $P < 0.05$), *IFIT3* (0.591 vs 0.777, $P < 0.01$), *IRF6* (0.446 vs 0.587, $P < 0.05$) and *PTGES* (0.357 vs 0.542, $P < 0.001$). Moreover, a significant difference was observed between 10 μM and 1 μM ENL for the *AKR1B1* mRNA abundance (0.474 vs 0.542, $P < 0.05$). A significant interaction between FA and ENL ($P < 0.05$) was obtained for *AKR1B1*, with the lowest mRNA abundance being observed when 10 μM ENL was combined with 20 μM of FA4. Finally, there was a trend for a FA effect on *TGFβ1* mRNA abundance ($0.05 < P < 0.1$) with higher mRNA levels being observed in stromal cells that had no added fat compared with those that received 20 μM FA4.

In epithelial cells (Table 3), the presence of ENL in culture media significantly increased *ANXA2* ($P < 0.05$) and tended to increase *ZFP36L1* mRNA abundance. In contrast, *IFIT3* transcript abundance significantly decreased ($P < 0.01$) and tended to decrease *GJAI* mRNA abundance when ENL was included in cell culture media. When comparing the different ENL concentrations, the 10 μM ENL treatment was associated with lower *IFIT3* mRNA abundance when compared with the 0 μM ENL treatment (0.679 vs 0.853, $P < 0.01$). Addition of 20 μM FA4 in culture media significantly decreased the mRNA abundance of *PARM1* ($P < 0.05$), *IFIT3* ($P < 0.01$), *OAS1* ($P < 0.01$) and *TGFβ1* ($P < 0.01$) and tended to reduce *CTGF*, *GJAI* and *ISG15* mRNA abundance ($0.05 < P < 0.1$).

TABLE 3. Effects of enterolactone combined or not with fatty acids LA/ALA ratio 4:1 on expression of selected genes in endometrial stromal and epithelial cells.

		Treatments									
		No FA			FA4						
		ENL 0 μM	ENL 1 μM	ENL 10 μM	ENL 0 μM	ENL 1 μM	ENL 10 μM	P-values			
Cell type	Genes ^a	COPI	E1	E10	FA4	E1FA	E10FA	SEM	ENL	FA	Interaction ENL*FA
Endometrial Stromal Cells (SC)	<i>AKR1B1</i>	0.567	0.520	0.506	0.520	0.564	0.442	0.106	0.006	0.204	0.038
	<i>DKK1</i>	0.578	0.500	0.412	0.591	0.434	0.449	0.124	0.019	0.899	0.561
	<i>IFIT3</i>	0.843	0.634	0.551	0.712	0.652	0.632	0.057	0.008	0.801	0.150
	<i>IRF6</i>	0.636	0.520	0.492	0.539	0.585	0.400	0.183	0.011	0.249	0.122
	<i>OAS1</i>	0.839	0.771	0.704	0.835	0.768	0.771	0.076	0.061	0.541	0.593
	<i>PTGES</i>	0.543	0.445	0.382	0.541	0.451	0.332	0.077	0.001	0.644	0.758
	<i>TGFB1</i>	0.683	0.675	0.586	0.589	0.633	0.553	0.085	0.052	0.056	0.627
	<i>ZFP36L1</i>	0.686	0.586	0.475	0.650	0.657	0.530	0.101	0.011	0.462	0.518
Endometrial Epithelial Cells (EC)	<i>ANXA2</i>	0.708	0.793	0.812	0.717	0.798	0.762	0.060	0.047	0.677	0.616
	<i>CTGF</i>	0.739	0.761	0.788	0.705	0.696	0.697	0.068	0.892	0.097	0.809
	<i>GJA1</i>	0.683	0.764	0.626	0.675	0.616	0.527	0.065	0.074	0.055	0.387
	<i>IFIT3</i>	0.918	0.848	0.686	0.789	0.686	0.673	0.062	0.003	0.009	0.198
	<i>ISG15</i>	0.714	0.759	0.663	0.572	0.616	0.621	0.082	0.715	0.052	0.669
	<i>OAS1</i>	0.812	0.796	0.761	0.751	0.688	0.678	0.080	0.195	0.007	0.780
	<i>PARM1</i>	0.549	0.648	0.616	0.479	0.572	0.500	0.122	0.184	0.047	0.882
	<i>TGFB1</i>	0.846	0.794	0.761	0.728	0.718	0.720	0.085	0.358	0.000	0.493
	<i>ZFP36L1</i>	0.759	0.846	0.862	0.769	0.816	0.788	0.047	0.087	0.231	0.409

Results represent mean values of relative mRNA abundance in endometrial cells from four cell culture experiments performed in triplicates. Results were compared with a 3x2 factorial arrangement. All culture media contained 10 nM of Progesterone and 50 nM of roIFN- γ . ^a*AKR1B1*, Aldo-keto reductase family 1, member B1; *ANXA2*, Annexin A2; *CTGF*, Connective tissue growth factor; *DKK1*, Dickkopf homolog 1; *GJA1*, Gap junction protein, alpha 1, 43kDa; *IFIT3*, Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3; *IRF6*, Interferon regulatory factor 6; *ISG15*, ISG15 ubiquitin-like modifier; *OAS1*, 2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa; *PARM1*, Prostate androgen-regulated mucin-like protein 1; *PTGES*, Prostaglandin E synthase; *TGFB1*, Transforming growth factor, beta 1; *ZFP36L1*, Zinc finger protein 36, C3H type-like 1. Treatments were COPI, control with progesterone and roIFN- γ ; E1, enterolactone (ENL.) 1 μ M; E10, enterolactone 10 μ M; FA4, 16 μ M LA + 4 μ M ALA, E1FA, enterolactone 1 μ M + FA4; E10FA, enterolactone 10 μ M + FA4.

Prostaglandins Concentrations in Stromal and Epithelial Cell Cultures

In addition to the relative mRNA abundance of selected genes, PG concentrations were also assessed in the culture media of stromal and epithelial cells. When performing a global analysis of PG secretion data (Fig. 4), there was an overall treatment effect for PGE₂ and PGF_{2α} secretion in SC and EC ($P < 0.001$). An overall treatment effect was also observed for the PGE₂/PGF_{2α} ratio in EC ($P < 0.01$) but not in SC. Multiple comparisons then revealed that treating SC with FA4 ($P < 0.001$), FA15 ($P < 0.05$) and FA $_{\infty}$ ($P < 0.01$) significantly increased PGE₂ secretion when compared with the COPI treatment. Significant increases in PGF_{2α} secretions were observed when SC were treated with the FA ratio of 4 (FA4 vs COPI, $P < 0.01$) and ∞ (FA $_{\infty}$ vs COPI, $P < 0.01$), whereas FA0 treatment decreased PGF_{2α} secretions (FA0 vs COPI, $P < 0.01$). In epithelial cells, PGE₂ secretions increased with the FA4, FA15, FA25 and FA $_{\infty}$ treatments compared with COPI ($P < 0.001$). The LA/ALA ratios of 15 (FA15 vs COPI, $P < 0.05$), 25 (FA25 vs COPI, $P < 0.05$) and ∞ (FA $_{\infty}$ vs COPI, $P < 0.001$) all increased PGF_{2α} secretions. On the opposite, treating epithelial cells with the LA/ALA ratios 0 (FA0 vs COPI, $P < 0.001$) and 1 (FA1 vs COPI, $P < 0.05$) significantly decreased PGF_{2α} secretions. Finally, the PGE₂/PGF_{2α} ratio was increased with the LA/ALA ratios of 0 (FA0 vs COPI, $P < 0.01$) and 4 (FA4 vs COPI, $P < 0.05$).

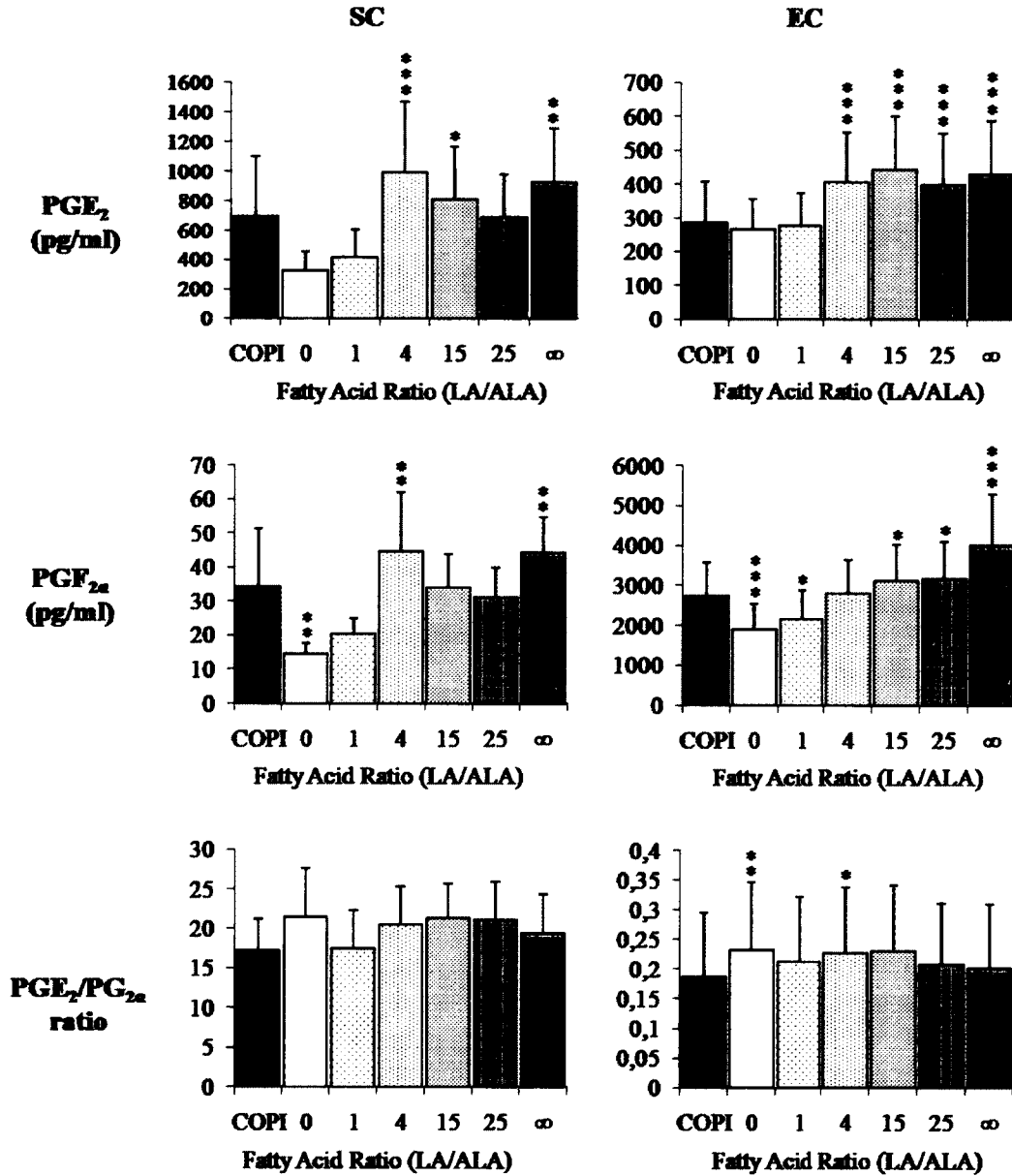


FIG. 4. Effects of the different fatty acids ratios on stromal and epithelial endometrial cells PGE₂ and PGF_{2α} secretions. Data represents prostaglandins and prostaglandins ratios mean values \pm SEM of four cell culture experiments performed in duplicates. Prostaglandins data were analyzed using a Friedman's test on rank transformed data followed by multiple comparisons of each treatment to the COPI control. When performing a global analysis of PG secretion data, there was an overall treatment effect for PGE₂ and PGF_{2α} secretion in SC and EC ($P < 0.001$) and for the PGE₂/PGF_{2α} ratio in EC ($P < 0.01$). COPI represents control with progesterone and rolFN- τ containing no added fatty acids. Fatty acid ratios where 0, 20 μ M ALA; 1, 10 μ M LA + 10 μ M ALA; 4, 16 μ M LA + 4 μ M ALA, 15, 18.75 μ M LA + 1.25 μ M ALA; 25, 19.23 μ M LA + 0.77 μ M ALA and ∞ , 20 μ M LA. SC, stromal cells; EC, epithelial cells. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Analyses of the effects of the different FA ratios on PG secretions were then performed separately. The all pair-wise multiple comparisons are presented in Figure 5. In stromal cells, PGE₂ and PGF_{2α} secretions were affected in the same way by the different LA/ALA ratios, the lower PG secretions being observed for cells treated with the LA/ALA ratios of 0 and 1 when compared with all other FA ratios ($P < 0.05$). The different FA ratios had no effect on the PGE₂/PGF_{2α} ratio in SC. In epithelial cells, the lowest PGE₂ and PGF_{2α} secretions were found in cells treated with the LA/ALA ratios of 0 and 1, which were significantly different from all other FA ratios ($P < 0.05$). The PGF_{2α} secretions measured in EC increased gradually with increasing LA/ALA ratios. The PGE₂/PGF_{2α} ratios were different between the LA/ALA ratio 0 and ∞ in EC ($P < 0.05$).

Prostaglandin secretions data in cell cultures treated with ENL (with or without FA) were also analyzed separately according to a 3 x 2 factorial arrangement of treatments (Table 4). In stromal cells, there was an overall ENL effect and FA effect for PGE₂ ($P < 0.05$) and PGF_{2α} (ENL, $P < 0.01$; FA, $P < 0.05$) secretions, whereas there was no effect on the PGE₂/PGF_{2α} ratio. When performing an all pair wise analysis on PGE₂ secretion, there was a tendency for lower PGE₂ concentrations in cells treated with 10 μ M ENL compared with 0 μ M ENL (598.16 vs 841.57 pg/ml, $0.05 < P < 0.1$) or 1 μ M ENL (598.16 vs 708.20 pg/ml, $0.05 < P < 0.1$). Similarly, lower PGF_{2α} concentrations were found in cells treated with 10 μ M ENL compared with 0 μ M ENL (23.58 vs 39.31 pg/ml, $P < 0.01$) or with 1 μ M ENL (tendency, 23.58 vs 30.23, $0.05 < P < 0.1$). For both PGE₂ and PGF_{2α} secretions, the interaction between ENL and FA tended to be significant ($0.05 < P < 0.1$).

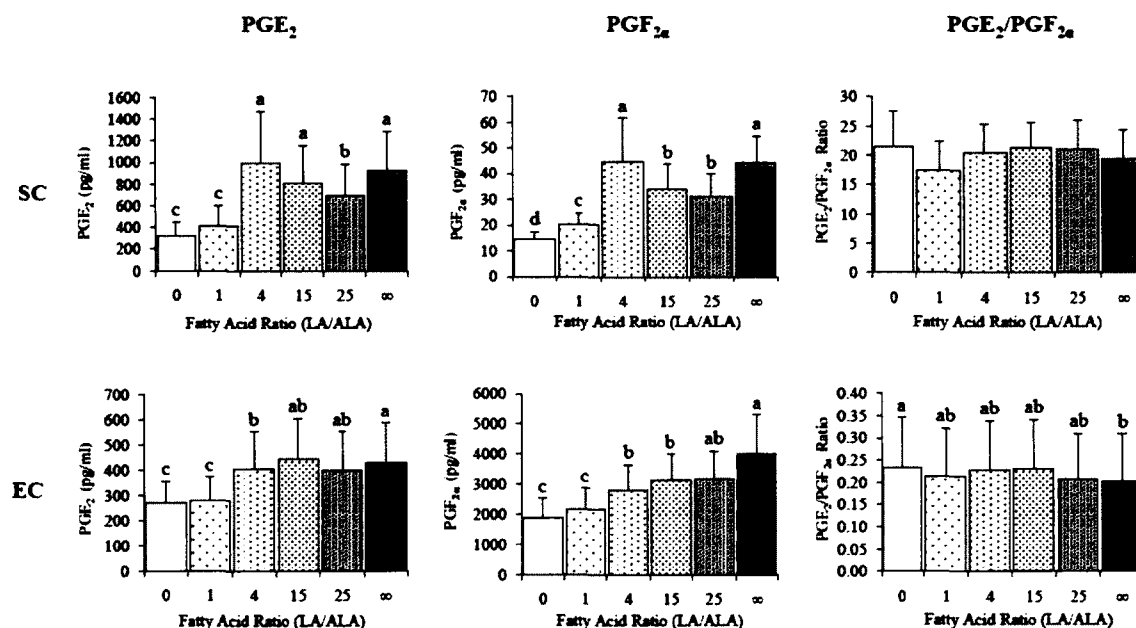


FIG. 5. Effects of the different fatty acid ratios (LA/ALA) treatments on stromal and epithelial endometrial cells PGE₂ and PGF_{2α} secretions. Data represents prostaglandins and prostaglandins ratios mean values \pm SEM of four cell culture experiments performed in duplicates. Prostaglandins data were analyzed using a Friedman's test on rank transformed data followed by all pair-wise multiple comparisons. Means with a different superscript differ at $P \leq 0.05$. Treatments were FA0, 20 μ M ALA; FA1, 10 μ M LA + 10 μ M ALA; FA4, 16 μ M LA + 4 μ M ALA, FA15, 18.75 μ M LA + 1.25 μ M ALA; FA25, 19.23 μ M LA + 0.77 μ M ALA; FA ∞ , 20 μ M LA. SC, stromal cells; EC, epithelial cells.

TABLE 4. Effects of enterolactone combined or not with fatty acids LA/ALA ratio 4:1 on PGE₂ and PGF_{2α} secretion from endometrial stromal and epithelial cells.

		Treatment						<i>P</i> -values		
		No FA			FA4					
		ENL 0 μM	ENL 1 μM	ENL 10 μM	ENL 0 μM	ENL 1 μM	ENL 10 μM			
Cell type	Prostaglandins	COPI	E1	E10	FA4	E1FA	E10FA	ENL	FA	Interaction ENL*FA
Endometrial Stromal Cells (SC)	PGE ₂ (pg/ml)	691.95 (74.97, 1867.10)	627.23 (199.99, 1177.03)	563.00 (144.21, 1254.29)	991.18 (248.97, 2361.43)	789.16 (142.16, 1515.83)	633.32 (96.44, 1374.55)	0.037	0.029	0.079
	PGF _{2α} (pg/ml)	34.06 (12.26, 85.31)	27.25 (15.27, 54.42)	26.12 (11.54, 65.69)	44.56 (25.67, 96.74)	33.20 (16.75, 78.69)	21.03 (14.26, 35.39)	0.006	0.039	0.089
	PGE ₂ /PGF _{2α}	17.27 (6.11, 23.53)	23.08 (13.10, 43.53)	25.48 (9.63, 60.88)	20.44 (9.70, 31.88)	27.09 (7.66, 65.22)	28.80 (6.50, 57.54)	0.792	0.534	0.967
Endometrial Epithelial Cells (EC)	PGE ₂ (pg/ml)	286.91 (95.12, 629.10)	317.81 (114.44, 665.42)	260.74 (92.79, 531.07)	406.22 (119.58, 760.84)	391.27 (111.45, 677.51)	269.26 (111.38, 479.01)	0.015	0.008	0.102
	PGF _{2α} (pg/ml)	2723.27 (1284.34, 4889.13)	3558.57 (1448.26, 5851.61)	2375.10 (1160.13, 3608.30)	2806.12 (1482.31, 5203.48)	2591.34 (1152.83, 4655.90)	2025.31 (1024.45, 3362.11)	0.002	0.007	0.006
	PGE ₂ /PGF _{2α}	0.19 (0.02, 0.49)	0.18 (0.02, 0.46)	0.19 (0.03, 0.46)	0.23 (0.02, 0.51)	0.28 (0.02, 0.57)	0.21 (0.03, 0.47)	0.642	< 0.001	0.758

Results represent mean values (lower, upper) of PG secretion from endometrial cells from four cell culture experiments performed in duplicates. Results were analysed using nonparametric Friedman test and compared with a 3x2 factorial arrangement. All culture media contained 10 nM of Progesterone and 50 nM of Interferon- τ . Treatments were COPI, control with progesterone and roIFN- τ ; E1, enterolactone (ENL) 1 μ M; E10, enterolactone 10 μ M; FA4, 16 μ M LA + 4 μ M ALA, E1FA, enterolactone 1 μ M + FA4; E10FA, enterolactone 10 μ M + FA4.

In epithelial cells, there was an overall ENL effect and FA effect for PGE₂ (ENL, $P < 0.05$; FA, $P < 0.01$) and PGF_{2 α} (ENL and FA, $P < 0.01$) secretions and a FA effect on the PGE₂/PGF_{2 α} ratio ($P = 0.001$). There was a significant ENL*FA interaction ($P < 0.01$) for PGF_{2 α} secretion, with the lowest secretion observed when 10 μ M ENL was combined with FA (FA4). The all pair-wise analysis for the ENL factor revealed lower PGE₂ secretion when cells were treated with 10 μ M ENL compared with those treated with 1 μ M ENL (265.00 vs 354.54 pg/ml, $P < 0.05$) or 0 μ M ENL (tendency, 265.00 vs 346.57 pg/ml, $0.05 < P < 0.1$). The lowest PGF_{2 α} secretions were obtained with the addition of 10 μ M ENL compared with 0 μ M ENL (2200.21 vs 2764.70 pg/ml, $P < 0.01$) and 1 μ M ENL (2200.21 vs 3074.96 pg/ml, $P < 0.01$). The presence of FA (FA4) in cell culture media significantly increased PGE₂ secretion ($P < 0.01$) and the PGE₂/PGF_{2 α} ratio ($P = 0.01$), whereas PGF_{2 α} secretions were decreased when both ENL and FA were present.

DISCUSSION

The present study aimed to enhance understanding on how selected genes' transcription levels and PG secretions vary under the action of different LA/ALA ratios and/or ENL concentrations in the bovine endometrium. To the best of our knowledge, the present study explores for the first time the direct and distinct effects of LA/ALA ratios and/or ENL on the two major endometrial cell types, SC and EC.

Genes that were selected in the current study were previously identified as endometrial transcripts differentially expressed when dairy cows were fed 10% flaxseed in the diet [25, 26]. Moreover, they were selected based on their known or suspected roles

in embryo implantation and survival. To characterize further the endometrial expression profiles of genes in vivo, real-time PCR analyses were performed to assess the mRNA abundance in endometrial tissue through the estrous cycle. The expression of *STC1* observed throughout the estrous cycle is concordant with previous findings [41], thus indicating that the different estrous cycle stages were identified properly. The relative mRNA abundance of selected genes in endometrial tissue revealed two distinct expression patterns, with an increase in *AKR1B1*, *DKK1* and *IRF6* transcript levels during the luteal phase (stages 2 and 3) and an increase in *ANXA2*, *GJA1*, *PTGES* and *TGFβ1* mRNA abundance during the follicular phase (stages 1 and 4). These results may suggest that ovarian hormones regulate gene expression of these genes in the endometrium. Moreover, a clear difference in mRNA abundance levels was observed between the luteal phase (stages 2 and 3), where high secretion of ovarian progesterone and uterine receptivity occurs, and the follicular phase (stages 4 and 1), which corresponds to increased secretions of estrogens, CL regression and entry into a new ovarian cycle [44]. Since luteolysis takes place at the beginning of stage 4 (day 18-21), in the absence of the embryo induced IFN-τ signal [44], genes showing contrasting mRNA abundance between stages 3 and 4 of the estrous cycle might be involved in embryo implantation and survival. In accordance with our results, *PTGES* mRNA abundance in the bovine endometrium was maximal during the proestrus (days 18-21) and metestrus (days 1-3) when compared with the diestrus stages [33, 45]. Moreover, the expression profiles of *ANXA2* and *GJA1* observed in the current study support previous findings where mRNA abundance of *ANXA2* and *GJA1* genes increased at estrous (day 0; stage 1) compared with diestrus (day 12; stage 3) in the bovine endometrium [31, 41]. Of interest, 17β-

estradiol increased mRNA abundance of *GJA1*, *PTGES* and *TGFβ1*, respectively, in the rat endometrium [46], MCF-7 breast cancer cells [47] and human endometrial stromal cells [48]. Altogether, these results suggest that estrogen may contribute to increase *GJA1*, *PTGES* and *TGFβ1* mRNA levels during stages 4 and 1 of the estrous cycle in the bovine endometrium, a period with high estrogen levels. The *AKR1B1* [31, 41] and *IRF6* [41] mRNA abundances has been shown to increase during the diestrous compared with the estrous stage in the bovine endometrium, which is in accordance with present results. Interestingly, the upregulation of *DKK1* mRNA levels with the addition of P₄ was previously reported in human endometrial stromal cells [49]. Moreover, on day 7 of the estrous cycle, the endometrial mRNA abundance of *DKK1* was lower in heifers having low P₄ concentrations compared with controls [50]. Collectively, the above studies and our findings suggest a link between circulating P₄ (highest during stages 2 and 3) and the expression of *AKR1B1*, *IRF6* and *DKK1* transcripts in the bovine endometrium.

In vivo, the bovine elongating conceptus secretes IFN-τ to signal its presence to the endometrium and P₄ is a pregnancy hormone that plays a key role in remodelling of the endometrium during the peri-implantation period [3, 28]. In order to mimic the peri-implantation period in our in vitro model, endometrial cultured cells were exposed to P₄ and roIFN-τ. Progesterone had little effects on the mRNA abundance of studied genes in SC and EC even though this hormone seemed to regulate the expression of *IRF6*, *AKR1B1* and *DKK1* transcripts in the bovine endometrium during the estrous cycle (see above). Discrepancies may be explained by the fact that the whole endometrial tissue was used to determine mRNA levels of selected genes through the estrous cycle, compared with isolated stromal and epithelial cells for our in vitro system. Moreover, we cannot

rule out the possibility that factors other than P₄ may increase the mRNA abundance of *AKR1B1* and *IRF6* during stages 2 and 3 of the estrous cycle. In this study, the roIFN- τ treatment successfully induced the expression of several genes in both cell types. In accordance with our results, it was previously observed that early pregnancy and/or IFN- τ can induce the transcription of the *CXCL10* [51], *DKK1* [23], *IFIT3* [52], *ISG15* [53], and *OAS1* [54] genes in the ruminant endometrium. Therefore, these similarities validate our in vitro cell culture system. In the current study we observed a modest increase in *ANXA2* mRNA abundance with the addition of roIFN- τ . *ANXA2* is considered as a positive regulator of invasive processes during the peri-implantation [22]. However, the embryo implantation in cow is non-invasive [22], which may explain the modest up-regulation of *ANXA2* mRNA when SC were treated with roIFN- τ . Of interest, we report for the first time the induction of *PARM1* transcript when roIFN- τ is added to the endometrial cells. This gene encodes for a mucine-like type I transmembrane protein that increases cell proliferation and whose expression is androgen-regulated [55] but it has no known function in female reproductive tissues. The observed upregulation of *PARM1* transcript with the addition of roIFN- τ suggests a putative role for PARM1 in establishment of early pregnancy in cattle.

In our primary endometrial cell culture system, we observed that the different LA/ALA ratios and/or ENL affected gene expression and series 2 PG secretions. Moreover, we report that the SC response to treatments differed from the EC response, thus suggesting that mechanisms influencing gene expression and PG secretions are regulated differently in those two cell types. In accordance with our results, Xiao and colleagues also observed a different regulation of PG synthesis in bovine EC and SC

when steroid hormones were added to the cell culture medium [56]. In the bovine endometrium, SC and EC have a different morphology and present different functions [34], which may explain the observed differences in gene expression and PG secretions between these two cell types. For example, it has been demonstrated earlier that PGE₂ is mainly produced by SC, while EC secrete higher levels of PGF_{2α} [34]. Similar findings are reported in the current study.

To the best of our knowledge, this study is the first one evaluating the direct effects of different LA/ALA ratios on PG secretions and gene expression in bovine endometrial primary cell cultures. Our results show that transcript levels of selected genes were affected by the different LA/ALA ratios. Moreover, when considering only the three physiologically observed ratios (FA4, FA15 and FA25), many of the studied genes showed decreased mRNA abundance with increasing N-6/N-3 ratios in both cell types. The FA4 ratio corresponds to the observed circulating ratio of FA in blood when dairy cows are fed a diet containing 10% flaxseed (rich in ALA). Interestingly, this ratio showed higher mRNA abundance of *CXCL10*, *CYP39A1* and *IFIT3* genes in SC and of *AKR1B1*, *CYP39A1* and *PTGES* genes in EC when compared with the FA25 ratio, which mimics cows fed 10% sunflower seeds (rich in LA). The *AKR1B1* and *PTGES* genes are coding for enzymes involved in PGF and PGE synthesis, respectively. An up-regulation of the *AKR1B1* gene may lead to higher levels of series 3 PG at the expense of series 2 PG when N-3 FA levels increase [57], which may enhance embryo survival. Moreover, an up-regulation of *PTGES* mRNA levels is desirable for embryo survival since PGE₂ has luteoprotective effects [5-7]. *CXCL10* [51] and *IFIT3* [52] are interferon-stimulated genes that are up-regulated during early pregnancy in response to embryo IFN-τ signal.

Therefore, the up-regulation of *CXCL10* and *IFIT3* mRNAs observed with the FA4 treatment compared with the FA25 treatment may be beneficial for embryo implantation and survival. The *CYP39A1* gene codes for a steroid hydroxylase, which prevents prolonged and inappropriate exposure to estrogen in mice [58]. Because estrogen levels must stay low during early pregnancy [59], an up-regulation of *CYP39A1* would favour embryo survival.

High LA/ALA ratios increased PGE₂ and PGF_{2α} secretions both in SC and EC compared to the control (COPI). Moreover, PGF_{2α} and PGE₂ secretions increased with greater LA/ALA ratios in EC, which is consistent with a previous study with bovine immortalized endometrial cells (BEND), where increasing LA/EPA ratios increases PGF_{2α} secretion [60]. In SC, PG secretions were affected by the different LA/ALA ratios, with the LA/ALA ratio FA4 (rich in n-3) having higher PGE₂ and PGF_{2α} secretion levels when compared with the LA/ALA ratio FA25 (rich in N-6). An increase in PGF_{2α} secretion in SC is not desirable for embryo survival because of its luteolytic properties [61]. However, the contribution of SC PGF_{2α} secretion to the total endometrial PGF_{2α} secretions is expected to be limited since PGF_{2α} secretion is much lower in SC than EC [34]. On the other hand, increased PGE₂ secretion in SC would favour embryo implantation based on its luteoprotective properties [5-7]. In this study, the addition of LA (FA∞, N-6) to EC decreased the PGE₂/PGF_{2α} ratio when compared with the addition of ALA (FA0, N-3), but there was no significant difference among other FA ratios. However, when the different FA ratios were compared with the control treatment (COPI), PGE₂/PGF_{2α} ratios were increased with FA0 and FA4 LA/ALA ratios, but this was only observed in EC. In accordance with our findings, Petit and colleagues [62] observed a

higher prostaglandin E metabolite (PGEM) to 13,14-dihydro-15-keto-PGF_{2α} (PGFM) ratio in uterine flushes of non-pregnant cows fed with 9.1% flaxseed in the diet (which corresponds to our FA4 treatment) when compared to cows fed the control diet (no added fat), thus showing that ALA can increase the PGE₂/PGF_{2α} ratio in vivo.

Flaxseed is rich in plant lignans that are converted in the cow's rumen mainly into the mammalian lignans enterolactone [63]. Plant and mammalian lignans possess antioxidant activities [64] and can act as phytoestrogens [22], which may explain, at least in part, the reproductive benefits observed when flaxseed is fed to cows [62]. However, the effects of lignans on reproductive functions have been poorly explored so far. In the current study, we show for the first time that the presence of ENL modulates series 2 PG secretions in EC and SC as well as the mRNA abundance of genes known or suspected to play a role in embryo implantation. Indeed, in both cell types, the addition of ENL decreased PGE₂ and PGF_{2α} secretions. Moreover, the greatest reductions in PGF_{2α} secretions were observed in EC when FA (FA4) was combined with ENL. However, our results demonstrate that the addition of ENL has no effect on the PGE₂/PGF_{2α} ratio and that the presence of FA4 alone seems to be sufficient to increase the PGE₂/PGF_{2α} ratio in EC. The increase in PGE₂/PGF_{2α} ratio in EC might protect the CL against luteolysis, which may favour embryo survival at the time of peri-implantation. However, further work is required to determine which of the following factors contribute the most in maintaining the CL: secretions of PGE₂ and PGF_{2α} or the PGE₂/PGF_{2α} ratio.

Among selected genes, *IFIT3*, *DKK1* and *IRF6* [65] are known interferon stimulated genes having positive effects on embryo survival during early pregnancy (see above). However, in the current study, the decreases in *IFIT3*, *DKK1* and *IRF6* mRNA

levels in SC and of *IFIT3* transcript levels in EC when ENL was added to the culture medium would not favour embryo survival. *ANXA2* is a gene involved in positive regulation of invasive growth [22] and in this study *ANXA2* transcript levels were up-regulated in EC by the addition of ENL. However, because implantation in cow is a non-invasive process, an up-regulation of *ANXA2* mRNA abundance would not necessarily improve embryo survival. It was earlier reported that *ZFP36L1* gene expression is essential to embryo survival [30, 66]. This gene is implicated in post-transcriptional control of gene expression and is a negative regulator of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A gene activity [66]. Here, we report for the first time a down-regulation of *ZFP36L1* transcript levels in SC with the addition of ENL. Further work is needed before being able to determine the physiological impact of the decreased expression of *ZFP36L1*.

Among genes that were modulated by ENL, two are coding for enzymes involved in PG synthesis [5]. These are *AKR1B1*, known as the primary enzyme responsible for PGF_{2α} production [67] and *PTGES* previously identified as the main enzyme responsible for PGE₂ synthesis [45]. Interestingly, we report that *AKR1B1* and *PTGES* mRNA levels were decreased in SC with the addition of ENL and this was associated with lower PGF_{2α} and PGE₂ secretions. This suggests that ENL may reduce PGE₂ and PGF_{2α} secretions by modifying the transcription levels of *PTGES* and *AKR1B1* genes in endometrial SC. Further work is needed to determine the reasons why *AKR1B1* and *PTGES* mRNA levels were not affected by ENL in EC despite the fact that ENL decreased PGE₂ and PGF_{2α} secretions. Other genes involved in PG synthesis, such as prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (*PTGS2*), might also be affected by treatments with ENL and/or FA ratios in

EC. The fact that *AKR1B1* and *PTGES* transcript levels under the different LA/ALA ratios did not follow PG secretion levels in EC further suggest that PG synthesis are regulated differently in SC and EC and that PG synthesis enzymes other than *AKR1B1* and *PTGES* may be involved. Moreover, we cannot rule out the possibility of posttranslational alteration of PG synthesis enzymes by ENL and/or fatty acids. Of interest, Caldari-Torres and colleagues previously reported an increase in *PTGS2* mRNA abundance in BEND cells treated with increasing LA/EPA ratios and this was accompanied by similar increases in $\text{PGF}_{2\alpha}$ secretion [60]. Moreover, in primary bovine epithelial cells, the AA induced $\text{PGF}_{2\alpha}$ and PGE_2 secretions were preceded by increases in *PTGS2* protein levels [68]. However, in BEND cells, EPA [60, 69] reduced and AA increased $\text{PGF}_{2\alpha}$ synthesis, but neither PUFA affected *PTGS2* mRNA abundance [10]. The *PTGS2* gene was not included in our list of selected genes because it was not identified as differentially expressed in whole endometrial tissue samples when dairy cows were fed 10% flaxseed [25, 26]. Nevertheless, it would be of interest to determine whether ENL and/or FA can modulate *PTGS2* protein levels or activity in our in vitro cell culture system.

Among the different mechanisms that have been suggested for explaining how N-3 and N-6 FA modulate series 2 PG secretions in endometrial cells, one of those concerns the possible inhibition of *PTGS2* enzyme activity by EPA, ALA and LA, previously identified as *PTGS2* inhibitors [70]. However, this mechanism is unlikely because in the current study PGE_2 and $\text{PGF}_{2\alpha}$ secretions were found to increase in EC treated with increasing LA/ALA ratios. In the current study, the lowest PGE_2 and $\text{PGF}_{2\alpha}$ concentrations were observed with the lowest LA/ALA ratios (e.g. high in N-3), whereas

the highest PGE₂ and PGF_{2α} secretions were obtained with the high LA/ALA ratios (e.g. high in N-6). A possible competition between N-3 and N-6 FA for enzymes involved in desaturation and elongation of long-chain FA or involved in PG synthesis may explain how N-3 and N-6 FA modulate PGE₂ and PGF_{2α} secretions [57, 61]. According to this last proposed mechanism, increased N-3 FA would favour the production of series 3 PG at the expense of series 2 PG. Although we found lower PGE₂ and PGF_{2α} secretions with higher N-3 FA, it remains to be determined whether this is accompanied with increases in series 3 PG.

In conclusion, our results demonstrate that different LA/ALA ratios and ENL can affect gene expression and PG secretions in primary bovine endometrial cells, with different effects being observed in EC and SC. The combination of ENL with FA (FA4) resulted in the greatest reduction in PGF_{2α} secretion, thus suggesting that feeding flaxseed to dairy cows would be a more efficient way of reducing PGF_{2α} secretions than giving flax oil or flax meal (rich in SDG) alone. Although *AKR1B1* and *PTGES* transcript levels were modulated in SC with the addition of ENL, these genes were not affected by ENL in EC. This would suggest that different molecular mechanisms are involved in SC and EC, with respect to PGE₂ and PGF_{2α} synthesis. Further work is needed to determine if other PG synthesis enzymes and/or FA converting enzymes are involved in the observed effects.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Danièle Beaudry, Marian Mayhue and Karine L'Ériger for technical assistance and to Steve Methot for the statistical analysis.

REFERENCES

1. Spencer TE, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Animal Reproduction Science* 2004; 82-83:537-550.
2. Bazer FW, Spencer TE, Ott TL. Interferon tau: A novel pregnancy recognition signal. *American Journal of Reproductive Immunology* 1997; 37:412-420.
3. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC, Palmarini M. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction, fertility, and development* 2007; 19:65-78.
4. Xiao CW, Murphy BD, Sirois J, Goff AK. Down-regulation of oxytocin-induced cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase expression by interferon-tau in bovine endometrial cells. *Biol Reprod* 1999; 60:656-663.
5. Arosh JA, Banu SK, Kimmins S, Chapdelaine P, Maclaren LA, Fortier MA. Effect of interferon-tau on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E2. *Endocrinology* 2004; 145:5280-5293.
6. Parent J, Chapdelaine P, Sirois J, Fortier MA. Expression of microsomal prostaglandin E synthase in bovine endometrium: Coexpression with cyclooxygenase type 2 and regulation by interferon- τ . *Endocrinology* 2002; 143:2936-2943.
7. Pratt BR, Butcher RL, Inskeep EK. Antiluteolytic effect of the conceptus and of PGE2 in ewes. *Journal of animal science* 1977; 45:784-791.
8. Mattos R, Staples CR, Thatcher WW. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Rev Reprod* 2000; 5:38-45.
9. Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research* 2008; 47:147-155.
10. Mattos R, Guzeloglu A, Badinga L, Staples CR, Thatcher WW. Polyunsaturated fatty acids and bovine interferon-tau modify phorbol ester-induced secretion of prostaglandin F2 alpha and expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and phospholipase-A2 in bovine endometrial cells. *Biol Reprod* 2003; 69:780-787.
11. Lessard M, Gagnon N, Petit HV. Immune response of postpartum dairy cows fed flaxseed. *J Dairy Sci* 2003; 86:2647-2657.
12. Robinson RS, Pushpakumara PG, Cheng Z, Peters AR, Abayasekara DR, Wathes DC. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. *Reproduction (Cambridge, England)* 2002; 124:119-131.
13. Coyne GS, Kenny DA, Childs S, Sreenan JM, Waters SM. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids alter the expression of genes involved in prostaglandin biosynthesis in the bovine uterus. *Theriogenology* 2008; 70:772-782.
14. Waters SM, Childs S, Sreenan JM, Hennessy A, Stanton C, Kenny DA. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on uterine endometrial gene expression of enzymes involved in prostaglandin biosynthesis in cattle. In: *Proceedings of the British Society of Animal Science*. Southport; 2007: 059.

15. Bilby TR, Guzeloglu A, MacLaren LA, Staples CR, Thatcher WW. Pregnancy, bovine somatotropin, and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: II. Endometrial gene expression related to maintenance of pregnancy. *J Dairy Sci* 2006; 89:3375-3385.
16. Ambrose DJ, Kastelic JP, Corbett R, Pitney PA, Petit HV, Small JA, Zalkovic P. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in alpha-linolenic acid. *J Dairy Sci* 2006; 89:3066-3074.
17. Petit HV, Germiquet C, Lebel D. Effect of feeding whole, unprocessed sunflower seeds and flaxseed on milk production, milk composition, and prostaglandin secretion in dairy cows. *J Dairy Sci* 2004; 87:3889-3898.
18. Petit HV, Twagiramungu H. Conception rate and reproductive function of dairy cows fed different fat sources. *Theriogenology* 2006; 66:1316-1324.
19. Petit HV, Benchaar C. Milk production, milk composition, blood composition, and conception rate of transition dairy cows fed different profiles of fatty acids. *Canadian Journal of Animal Science* 2007; 87:591-600.
20. Gagnon N, Cortes C, da Silva D, Kazama R, Benchaar C, Dos Santos G, Zeoula L, Petit HV. Ruminal metabolism of flaxseed (*Linum usitatissimum*) lignans to the mammalian lignan enterolactone and its concentration in ruminal fluid, plasma, urine and milk of dairy cows. *Br J Nutr* 2009;1-9.
21. Adolphe JL, Whiting SJ, Juurlink BHJ, Thorpe LU, Alcorn J. Health effects with consumption of the flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. *British Journal of Nutrition* 2010; 103:929-938.
22. Bauersachs S, Mitko K, Ulbrich SE, Blum H, Wolf E. Transcriptome studies of bovine endometrium reveal molecular profiles characteristic for specific stages of estrous cycle and early pregnancy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008; 116:371-384.
23. Bauersachs S, Ulbrich SE, Gross K, Schmidt SE, Meyer HH, Wenigerkind H, Vermehren M, Sinowatz F, Blum H, Wolf E. Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *Reproduction* 2006; 132:319-331.
24. Klein C, Bauersachs S, Ulbrich SE, Einspanier R, Meyer HH, Schmidt SE, Reichenbach HD, Vermehren M, Sinowatz F, Blum H, Wolf E. Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the preattachment period. *Biol Reprod* 2006; 74:253-264.
25. Palin MF, Beaudry D, Vallée M, Bissonnette N, Murphy BD, Petit HV. Development of a two-species cDNA microarray for transcriptional profiling of sow and dairy cow reproductive traits. In: ADSA-CSAS-ASAS Joint Conference, Montréal, Québec. *Journal of Animal Science* 2009; 87: E-Suppl.2/Journal of Dairy Science 2009; 92 E-Suppl.2: 399. Abstract W47.
26. Palin MF, Brochu-Gaudreau K, Small JA, Beaudry D, Petit HV. Use of subtractive hybridization to identify genes affected by omega 3 fatty acids in day 17 embryos and endometrial tissues. In: Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 13-18 August, 2006. Minas Gerais: Instituto Prociencia; 2006: 11-12.
27. Short EC, Jr., Geisert RD, Helmer SD, Zavy MT, Fulton RW. Expression of antiviral activity and induction of 2',5'-oligoadenylate synthetase by conceptus

- secretory proteins enriched in bovine trophoblast protein-1. *Biology of reproduction* 1991; 44:261-268.
28. Pru JK, Austin KJ, Haas AL, Hansen TR. Pregnancy and interferon-tau upregulate gene expression of members of the 1-8 family in the bovine uterus. *Biol Reprod* 2001; 65:1471-1480.
 29. Zhang H, Lai Q. Transcription and translation of Dickkopf-1 in endometrium of pregnant mice during the peri-implantation period. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban* 2004; 24:625-627, 638.
 30. Stumpo DJ, Byrd NA, Phillips RS, Ghosh S, Maronpot RR, Castranio T, Meyers EN, Mishina Y, Blackshear PJ. Chorioallantoic fusion defects and embryonic lethality resulting from disruption of Zfp36L1, a gene encoding a CCHC tandem zinc finger protein of the Tristetraprolin family. *Molecular and cellular biology* 2004; 24:6445-6455.
 31. Bauersachs S, Ulbrich SE, Gross K, Schmidt SE, Meyer HH, Einspanier R, Wenigerkind H, Vermehren M, Blum H, Sinowatz F, Wolf E. Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes. *J Mol Endocrinol* 2005; 34:889-908.
 32. Ireland JJ, Murphee RL, Coulson PB. Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *J Dairy Sci* 1980; 63:155-160.
 33. Arosh JA, Parent J, Chapdelaine P, Sirois J, Fortier MA. Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. *Biol Reprod* 2002; 67:161-169.
 34. Fortier MA, Guilbault LA, Grasso F. Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 1988; 83:239-248.
 35. Xiao CW, Goff AK. Differential effects of oestradiol and progesterone on proliferation and morphology of cultured bovine uterine epithelial and stromal cells. *J Reprod Fertil* 1998; 112:315-324.
 36. Ramsay TG. Porcine leptin alters insulin inhibition of lipolysis in porcine adipocytes in vitro. *Journal of animal science* 2001; 79:653-657.
 37. Parent J, Villeneuve C, Alexenko AP, Ealy AD, Fortier MA. Influence of different isoforms of recombinant trophoblastic interferons on prostaglandin production in cultured bovine endometrial cells. *Biol Reprod* 2003; 68:1035-1043.
 38. Weems CW, Lee CN, Weems YS, Vincent DL. Distribution of Progesterone to the Uterus and Associated Vasculature of Cattle. *Endocrinologia Japonica* 1988; 35:625-630.
 39. Guzeloglu A, Michel F, Thatcher WW. Differential effects of interferon-tau on the prostaglandin synthetic pathway in bovine endometrial cells treated with phorbol ester. *J Dairy Sci* 2004; 87:2032-2041.
 40. Farmer C, Palin MF, Gilani GS, Weiler H, Vignola M, Choudhary RK, Capuco AV. Dietary genistein stimulates mammary hyperplasia in gilts. *Animal* 2010; 4:454-465.

41. Mitko K, Ulbrich SE, Wenigerkind H, Sinowatz F, Blum H, Wolf E, Bauersachs S. Dynamic changes in messenger RNA profiles of bovine endometrium during the oestrous cycle. *Reproduction* 2008; 135:225-240.
42. Applied Biosystems. User Bulletin No. 2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. Foster City, CA, USA: Applied Biosystems. 1997
43. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 2002; 3.
44. Goff AK. Steroid hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the estrous cycle. *Biol Reprod* 2004; 71:11-16.
45. Parent J, Fortier MA. Expression and contribution of three different isoforms of prostaglandin E synthase in the bovine endometrium. *Biol Reprod* 2005; 73:36-44.
46. Grummer R, Chwalisz K, Mulholland J, Traub O, Winterhager E. Regulation of connexin26 and connexin43 expression in rat endometrium by ovarian steroid hormones. *Biology of reproduction* 1994; 51:1109-1116.
47. Frasor J, Weaver AE, Pradhan M, Mehta K. Synergistic up-regulation of prostaglandin E synthase expression in breast cancer cells by 17beta-estradiol and proinflammatory cytokines. *Endocrinology* 2008; 149:6272-6279.
48. Arici A, MacDonald PC, Casey ML. Modulation of the levels of transforming growth factor beta messenger ribonucleic acids in human endometrial stromal cells. *Biology of reproduction* 1996; 54:463-469.
49. Tulac S, Overgaard MT, Hamilton AE, Jumbe NL, Suchanek E, Giudice LC. Dickkopf-1, an inhibitor of Wnt signaling, is regulated by progesterone in human endometrial stromal cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2006; 91:1453-1461.
50. Forde N, Beltman ME, Duffy GB, Duffy P, Mehta JP, Ó'Gaora P, Roche JF, Lonergan P, Crowe MA. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: Effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biology of reproduction* 2011; 84:266-278.
51. Gray CA, Abbey CA, Beremand PD, Choi Y, Farmer JL, Adelson DL, Thomas TL, Bazer FW, Spencer TE. Identification of endometrial genes regulated by early pregnancy, progesterone, and interferon tau in the ovine uterus. *Biology of reproduction* 2006; 74:383-394.
52. Mansouri-Attia N, Aubert J, Reinaud P, Giraud-Delville C, Taghouti G, Galio L, Everts RE, Degrelle S, Richard C, Hue I, Yang X, Tian XC, et al. Gene expression profiles of bovine caruncular and intercaruncular endometrium at implantation. *Physiological Genomics* 2009; 39:14-27.
53. Hansen TR, Austin KJ, Johnson GA. Transient ubiquitin cross-reactive protein gene expression in the bovine endometrium. *Endocrinology* 1997; 138:5079-5082.
54. Schmitt RA, Geisert RD, Zavy MT, Short EC, Blair RM. Uterine cellular changes in 2',5'-oligoadenylate synthetase during the bovine estrous cycle and early pregnancy. *Biology of reproduction* 1993; 48:460-466.
55. Fladeby C, Gupta SN, Barois N, Lorenzo PI, Simpson JC, Saatcioglu F, Bakke O. Human PARM-1 is a novel mucin-like, androgen-regulated gene exhibiting

- proliferative effects in prostate cancer cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 2008; 122:1229-1235.
56. Xiao CW, Liu JM, Sirois J, Goff AK. Regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase gene expression by steroid hormones and interferon-tau in bovine endometrial cells. *Endocrinology* 1998; 139:2293-2299.
 57. Wathes DC, Abayasekara DR, Aitken RJ. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod* 2007; 77:190-201.
 58. Omoto Y, Lathe R, Warner M, Gustafsson JA. Early onset of puberty and early ovarian failure in CYP7B1 knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102:2814-2819.
 59. Henricks DM, Dickey JF, Hill JR, Johnston WE. Plasma estrogen and progesterone levels after mating, and during late pregnancy and postpartum in cows. *Endocrinology* 1972; 90:1336-1342.
 60. Caldari-Torres C, Rodriguez-Sallaberry C, Greene ES, Badinga L. Differential effects of n-3 and n-6 fatty acids on prostaglandin F2alpha production by bovine endometrial cells. *J Dairy Sci* 2006; 89:971-977.
 61. Abayasekara DR, Wathes DC. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1999; 61:275-287.
 62. Petit HV, Small JA, Palin MF, Giguère A, Santos GTD. Effects of flaxseed supplementation on endometrial expression of ISG17 and intrauterine prostaglandin concentrations in primiparous dairy cows submitted to GnRH-based synchronized ovulation. *Canadian Journal of Animal Science* 2007; 87:343-352.
 63. Adlercreutz H, Mazur W. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Annals of medicine* 1997; 29:95-120.
 64. Prasad K. Antioxidant activity of secoisolariciresinol diglucoside-derived metabolites, secoisolariciresinol, enterodiol, and enterolactone. *International Journal of Angiology* 2000; 9:220-225.
 65. Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Spencer TE, Wu G. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. *Reproductive biology* 2008; 8:179-211.
 66. Bell SE, Sanchez MJ, Spasic-Boskovic O, Santalucia T, Gambardella L, Burton GJ, Murphy JJ, Norton JD, Clark AR, Turner M. The RNA binding protein Zfp361l is required for normal vascularisation and post-transcriptionally regulates VEGF expression. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2006; 235:3144-3155.
 67. Zakrzewska E, Madore E, Chapdelaine P, Fortier MA. Downregulation of AKR1B1 and MPGES1 by RNA silencing reduces prostaglandin production in human endometrial cells. In: *Annual Meeting, Society for the Study of Reproduction: Biology of Reproduction* 2005: (Special Issue): M760 (Abstract).
 68. Parent J, Villeneuve C, Fortier MA. Evaluation of the contribution of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 to the production of PGE2 and PGF2 alpha in epithelial cells from bovine endometrium. *Reproduction (Cambridge, England)* 2003; 126:539-547.

69. Thatcher WW, Guzeloglu A, Mattos R, Binelli M, Hansen TR, Pru JK. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology* 2001; 56:1435-1450.
70. Ringbom T, Huss U, Stenholm A, Flock S, Skattebol L, Perera P, Bohlin L. Cox-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids. *Journal of natural products* 2001; 64:745-749.

CHAPITRE 2

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

L'objectif de cette étude était d'étudier l'effet direct de différents ratios d'acides gras (AG) n-6/n-3 (LA/ALA) et/ou de l'ENL sur les niveaux d'ARNm de gènes sélectionnés et sur la sécrétion des prostaglandines (PG) dans les cellules stromales (SC) et épithéliales (EC) endométriales bovines en culture primaire. Afin d'atteindre ces objectifs, **trois hypothèses** ont été émises.

Premièrement, nous avons émis l'hypothèse que **différents ratios d'AG n-6/n-3 (LA/ALA), de même que la présence d'ENL influencent le niveau d'expression des gènes sélectionnés**. Les gènes sélectionnés pour cette étude correspondent à des gènes différentiellement exprimés dans l'endomètre de vaches nourries ou non avec un supplément de graine de lin (Palin *et al.*, 2009; Palin *et al.*, 2006). De plus, ces gènes ont été sélectionnés sur la base d'un rôle potentiel pour la survie embryonnaire pendant la période de péri-implantation. Les résultats obtenus permettent de confirmer cette hypothèse et démontrent que l'ENL et/ou le ratio d'AG LA /ALA influencent directement le niveau d'expression des différents gènes sélectionnés. En effet, pour chacun des gènes sélectionnés, le niveau d'ARNm a été modulé soit par l'ENL, le ratio LA/ALA ou la combinaison des deux dans au moins un des types cellulaires étudiés. De plus, les EC et les SC ont répondu différemment aux différents traitements, suggérant que ces deux types cellulaires utilisent des voies métaboliques distinctes en réponse à un même traitement. Parmi les gènes étudiés, deux codent pour des enzymes responsables respectivement de la synthèse de $\text{PGF}_{2\alpha}$ et de PGE_2 : *AKR1B1* et *PTGES*. Les résultats de notre étude suggèrent que dans les SC, l'ENL entraîne une diminution de la sécrétion de $\text{PGF}_{2\alpha}$ et de PGE_2 qui pourrait être due à la diminution du niveau d'ARNm d'*AKR1B1* et *PTGES*, respectivement. Cependant, dans le cas des EC, la variation d'expression de ces deux gènes n'est pas associée à la sécrétion des PG et ce, pour tous les traitements étudiés. Cela suggère donc que la sécrétion des PG dans les EC n'est pas régulée par la

transcription des gènes *AKR1B1* et *PTGES* dans le cas des traitements étudiés. Cependant, nous ne pouvons exclure la possibilité d'une régulation au niveau de la traduction des ARNm ou encore au niveau de l'activité des enzymes produites. Selon certaines études, ce serait plutôt le gène *PTGS2* qui serait modulé par les AG et qui serait responsable d'une variation du niveau de PG sécrétées par les EC (Caldari-Torres *et al.*, 2006; Parent *et al.*, 2003). Nos résultats suggèrent également que le gène *OAS1* pourrait être lié à la synthèse des PG, puisque son profil d'expression est proportionnel ou inversement proportionnel à la sécrétion des PG, dépendamment du traitement. Cette association entre *OAS1* et la synthèse des PG avait également été observée dans une autre étude (Schmitt *et al.*, 1993). Notre étude démontre pour la première fois que le gène prostate androgen-regulated mucin-like protein 1 (*PARMI*) pourrait être impliqué dans la survie embryonnaire. En effet, nos résultats démontrent que l'expression de ce gène est induite dans les SC et les EC par l'IFN- τ , suggérant un rôle probable au moment de la péri-implantation embryonnaire.

Dans le sérum des vaches supplémentées avec de la graine de lin (10% de la ration), nous observons une augmentation des concentrations d'ENL (Gagnon *et al.*, 2009). De plus, ces vaches présentent des ratios d'AG n-6/n-3 circulants de 4, contrairement à des ratios n-6/n-3 de 15 ou de 25 observés lorsqu'elles reçoivent des traitements alimentaires moins riches en oméga-3 et plus riches en oméga-6 (Lessard *et al.*, 2003; Petit *et al.*, 2004). Selon les résultats de la présente étude, l'abondance d'ARNm des gènes *AKR1B1*, cytochrome P450, family 39, subfamily A, polypeptide 1 (*CYP39A1*) et interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (*IFIT3*) est augmentée avec un ratio LA/ALA de 4 (FA4) par rapport au ratio de 25 (FA25) dans au moins un des deux types cellulaires étudiés. La surexpression de ces gènes, préalablement observée dans un modèle *in vivo* avec l'addition de graine de lin à la ration alimentaire (Palin *et al.*, 2009; Palin *et al.*, 2006), pourrait donc être causée directement par la diminution du ratio LA/ALA dans le sérum des vaches laitières. Nos résultats démontrent également qu'*in vitro*, l'addition d'ENL tend à augmenter l'abondance d'ARNm du gène zinc finger protein 36, C3H type-like 1 (*ZFP36L1*) dans les EC et tend à diminuer l'abondance

d'ARNm de transforming growth factor, beta 1 (*TGFB1*) dans les SC, ces deux gènes étant respectivement sur-exprimés et sous-exprimés *in vivo* lorsque les vaches reçoivent un supplément de graine de lin (Palin *et al.*, 2009; Palin *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent que l'ENL pourrait être responsable de la modulation de ces deux gènes par la graine de lin *in vivo*. Cependant, en ce qui concerne les niveaux d'expression, il ne semble pas y avoir de liens entre l'étude *in vitro* et les études *in vivo* dans le cas des autres gènes à l'étude. Même que dans certains cas, les effets *in vitro* de l'ENL ou du ratio LA/ALA 4 (FA4) entrent en contradiction avec les résultats obtenus *in vivo*. Les différences entre les études *in vivo* et la présente étude *in vitro* pourraient s'expliquer par le fait que dans les études *in vivo*, les résultats ont été obtenus à partir de biopsies d'endomètre, comprenant plusieurs types cellulaires, alors qu'ici, les différents types cellulaires étaient séparés. De plus, lorsque les AG sont donnés dans l'alimentation, ils peuvent subir des transformations une fois dans l'organisme, lesquelles n'ont pas lieu lorsque les AG sont ajoutés directement sur les cellules en culture *in vitro*. Premièrement, les AG polyinsaturés sont en partie modifiés au niveau du rumen par la biohydrogénation, ce qui peut modifier leurs propriétés (Chilliard *et al.*, 2000b). Ensuite, les AG ingérés peuvent subir une conversion par les enzymes désaturases et élongases dans différents tissus exportateurs d'AG, avant d'être incorporés dans les cellules de l'endomètre (Mattos *et al.*, 2000). Ces modifications des AG peuvent modifier leurs effets sur les cellules endométriales. Les AG peuvent également être utilisés pour produire de l'énergie via la β -oxydation (Jump, 2002), ce qui pourrait diminuer leur disponibilité pour le tissu endométrial. Il se pourrait également que d'autres composantes de la graine de lin, non étudiées ici, aient un effet direct encore méconnu sur l'expression des gènes sélectionnés.

Notre deuxième hypothèse était que **la diminution du ratio n-6/n-3 (LA/ALA) entraîne une diminution de la sécrétion des $\text{PGF}_{2\alpha}$ et des PGE_2 dans les cellules endométriales bovines en culture**. Nos résultats ont permis de confirmer cette hypothèse. Ainsi, dans les EC, la diminution du ratio LA /ALA a entraîné une diminution proportionnelle de la sécrétion des PG de série 2 (PGE_2 et $\text{PGF}_{2\alpha}$). Cependant, dans les SC, le ratio LA/ALA de 4 (FA4, ratio observé dans le sérum des vaches nourries avec un

supplément de graine de lin) a entraîné la plus importante sécrétion de $\text{PGF}_{2\alpha}$ et de PGE_2 . Cela pourrait s'avérer bénéfique pour la survie embryonnaire dans un contexte *in vivo*, car une augmentation de sécrétion de PGE_2 favorise le maintien du corps jaune (Arosh *et al.*, 2004; Parent *et al.*, 2002; Pratt *et al.*, 1977). Par contre, une augmentation de $\text{PGF}_{2\alpha}$, qui a une activité anti-lutéolytique, n'est pas souhaitable. Néanmoins, cet effet indésirable dans les SC serait probablement sans conséquences *in vivo* puisque les EC sont les cellules qui sécrètent principalement la $\text{PGF}_{2\alpha}$ et que les SC sécrètent surtout la PGE_2 (Fortier *et al.*, 1988), tel qu'observé dans la présente étude. À notre surprise, l'addition d'ENL dans le milieu de culture a entraîné une diminution de la sécrétion des $\text{PGF}_{2\alpha}$ et des PGE_2 dans les SC et les EC. À notre connaissance, il s'agit de la première évidence démontrant un effet de l'ENL sur la sécrétion des PG, par des cellules endométriales. La diminution de sécrétion des $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans l'endomètre est essentielle à la survie embryonnaire au moment de la péri-implantation (Xiao *et al.*, 1999) et nous observons que l'ENL favorise cette diminution *in vitro*. Nos résultats suggèrent que l'effet bénéfique d'un supplément alimentaire de graine de lin sur la survie embryonnaire chez la vache laitière serait en partie attribuable à une meilleure inhibition de la sécrétion de $\text{PGF}_{2\alpha}$ grâce à la présence d'ENL. Aussi, les plus fortes diminutions de $\text{PGF}_{2\alpha}$ par les cellules endométriales cultivées ici sont observées lorsque l'ENL est combinée avec les AG ayant un ratio LA/ALA de 4 (FA4). La diminution observée de sécrétion de $\text{PGF}_{2\alpha}$ et PGE_2 par l'ENL et par la diminution du ratio n-6/n-3 (LA/ALA) pourrait être médiée en partie par une diminution du niveau d'expression de gènes tels qu'*AKR1B1*, *PTGES* ou *PTGS2*, tel que discuté plus tôt. Cependant, les résultats obtenus ici, ainsi que ceux provenant d'autres études, suggèrent que le niveau d'ARNm de ces gènes n'est pas toujours modulé en association avec la sécrétion des PG et qu'il y aurait d'autres mécanismes impliqués (Caldari-Torres *et al.*, 2006; Mattos *et al.*, 2003; Thatcher *et al.*, 2001). Par exemple, puisque l'ALA diminue et que le LA fait augmenter la sécrétion de PG de série 2 dans les cellules en culture étudiées par rapport au traitement contrôle (COPI), cela suggèrent que ces AG pourraient être convertis en EPA ou en AA, respectivement, via les élongases et les désaturases (voir figure 5). En effet, seul l'EPA agit comme précurseur de la synthèse des PG de série 3 et seul l'AA est converti en PG de série 2 (Mattos *et al.*, 2000; Wathes *et al.*, 2007). Il est donc probable que le ratio n-

6/n-3 (LA/ALA) influence la sécrétion de PGE_2 et de $\text{PGF}_{2\alpha}$ via une compétition entre les n-6 et les n-3 pour les enzymes de conversion des AG et les enzymes de synthèse des PG (Abayasekara et Wathes, 1999; Barnouin et Chassagne, 1991; Wathes *et al.*, 2007). En ce qui concerne l'ENL, d'autres études seront nécessaires afin d'élucider les mécanismes d'action impliqués.

Troisièmement, nous avons émis l'hypothèse que **la diminution du ratio n-6/n-3 (LA/ALA) entraîne une augmentation du ratio $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ dans les cellules endométriales bovines**. Les résultats démontrent que le ratio $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ a effectivement augmenté lorsque le ratio LA/ALA était le plus petit (seulement ALA, FA0) comparé au ratio LA/ALA le plus élevé (seulement LA, FA ∞) mais seulement dans les EC. De plus, l'addition d'AG avec un ratio LA/ALA de 4 (FA4) augmente le ratio $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ par rapport au contrôle sans addition d'AG dans le milieu de culture (COPI) des EC seulement. Cependant, l'ENL n'a entraîné aucune diminution significative du ratio $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$. De façon similaire, une étude précédente a démontré qu'un supplément alimentaire de graine de lin (correspondant ici au ratio FA4) peut augmenter le ratio PGEM/PGFM (les métabolites de PGE_2 et $\text{PGF}_{2\alpha}$) *in vivo* (Petit *et al.*, 2007). Les résultats *in vitro* obtenus ici suggèrent que cette augmentation du ratio $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ *in vivo* serait probablement plus due à la présence d'AG au ratio LA/ALA de 4 qu'à la diminution du ratio d'AG n-6/n-3 dans le sérum par rapport au contrôle. En effet, le ratio LA/ALA de 0 (FA0), permettant d'augmenter le ratio $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ dans la présente étude, n'est pas physiologiquement possible à atteindre chez la vache laitière. Cette approche ne serait donc pas envisageable commercialement pour améliorer la survie embryonnaire des vaches laitières.

En conclusion, la présente étude *in vitro* a permis d'atteindre notre objectif de départ, c'est-à-dire de discriminer les effets direct de l'ENL et/ou de différents ratios LA/ALA sur les SC et les EC endométriales bovines en culture primaire. De plus, les résultats obtenus lors de ce projet de recherche permettent de confirmer nos trois hypothèses de

départ. En effet, la présence d'ENL et la variation du ratio d'AG LA/ALA modifient tous deux l'abondance d'ARNm des gènes sélectionnés. Le ratio LA/ALA de 4 (FA4) semble être le plus favorable à l'expression des gènes impliqués dans l'implantation embryonnaire, tandis que l'ENL semble diminuer le niveau d'expression des gènes favorables à la survie embryonnaire. D'un autre côté, la présence d'ENL et la diminution du ratio d'AG LA/ALA modifient la sécrétion de PG de manière favorable au maintien du corps jaune et à la survie embryonnaire. Nous avons également observé une augmentation du ratio $PGE_2/PGF_{2\alpha}$ lorsque le ratio LA/ALA diminue. Nos résultats démontrent également que les SC répondent différemment des EC aux différents traitements. De plus, notre étude démontre pour la première fois le rôle de l'ENL sur les cellules de l'endomètre bovin. Ces résultats apportent de nouvelles explications permettant de mieux comprendre comment un supplément alimentaire de graine de lin peut améliorer la survie embryonnaire chez les vaches laitières. De plus, nous avons observé que c'est la combinaison de l'ENL et des AG, à un ratio LA/ALA de 4 (FA4), qui a entraîné les plus importantes diminutions de sécrétion de $PGF_{2\alpha}$. Comme l'ENL est dérivé des lignanes présentes surtout dans l'écorce de la graine de lin, nos résultats suggèrent qu'il serait préférable de nourrir les vaches laitières avec la graine entière plutôt qu'avec seulement les huiles ou seulement l'écorce, afin de bénéficier des effets de l'ENL, mais également des effets d'un ratio LA/ALA plus petit. Évidemment, cette hypothèse nécessitera une validation avec une étude *in vivo*. D'autres recherches seront également nécessaires pour mieux comprendre comment l'ENL module le niveau d'expression des gènes et entraîne la diminution de la sécrétion des PG de série 2. Puisque nous avons sélectionnés seulement 16 gènes différentiellement exprimés chez les vaches nourries avec un supplément de graine de lin lors des études de transcriptomique antérieures (Palin *et al.*, 2009; Palin *et al.*, 2006), il serait intéressant d'étudier les effets d'autres gènes candidats ayant aussi été identifiés comme étant différentiellement exprimés. En effet, ces gènes pourraient aussi jouer un rôle dans la survie embryonnaire. Ensuite, puisque nos résultats suggèrent que la diminution du ratio LA/ALA favorise la conversion des n-3 au détriment des n-6 par les différentes enzymes désaturases et élongases, il serait intéressant de vérifier si la sécrétion des PG de série 3 par les cellules endométriales augmentent réellement. De plus, il serait pertinent d'étudier plus en détail

le rôle des PG de série 3 dans la reproduction, rôle qui reste plutôt méconnu pour l'instant. Évidemment, puisque cette étude portait seulement sur l'endomètre, il serait pertinent de poursuivre des recherches visant à observer les effets de différents ratios LA/ALA et de l'ENL sur le développement embryonnaire.

BIBLIOGRAPHIE

Abayasekara, D.R., and Wathes, D.C. (1999). Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 61, 275-287.

Adolphe, J.L., Whiting, S.J., Juurlink, B.H.J., Thorpe, L.U., and Alcorn, J. (2010). Health effects with consumption of the flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. *British Journal of Nutrition* 103, 929-938.

Agriculture et Agroalimentaire Canada (2009). Aperçu de l'industrie laitière canadienne, Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, ON.

Agriculture et Agroalimentaire Canada, Commission canadienne du lait, Producteurs laitiers du Canada, and Association des Transformateurs Laitiers du Canada (2008a). 2008 L'industrie laitière en chiffres, pp. 51.

Agriculture et Agroalimentaire Canada, Commission canadienne du lait, Producteurs laitiers du Canada, and Association des Transformateurs Laitiers du Canada (2008b). 2008 L'industrie laitière en chiffres, pp. 44.

Al-Gubory, K.H., Garrel, C., Delatouche, L., Heyman, Y., and Chavatte-Palmer, P. (2010). Antioxidant adaptive responses of extraembryonic tissues from cloned and non-cloned bovine conceptuses to oxidative stress during early pregnancy. *Reproduction* 140, 175-181.

Ambrose, D.J., Kastelic, J.P., Corbett, R., Pitney, P.A., Petit, H.V., Small, J.A., and Zalkovic, P. (2006). Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in alpha-linolenic acid. *J Dairy Sci* 89, 3066-3074.

Arechiga, C.F., Vazquez-Flores, S., Ortiz, O., Hernandez-Ceron, J., Porras, A., McDowell, L.R., and Hansen, P.J. (1998). Effect of injection of beta-carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology* 50, 65-76.

Arosh, J.A., Banu, S.K., Kimmins, S., Chapdelaine, P., Maclaren, L.A., and Fortier, M.A. (2004). Effect of interferon-tau on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E2. *Endocrinology* 145, 5280-5293.

Arosh, J.A., Parent, J., Chapdelaine, P., Sirois, J., and Fortier, M.A. (2002). Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. *Biol Reprod* 67, 161-169.

Barnouin, J., and Chassagne, M. (1991). An aetiological hypothesis for the nutrition-induced association between retained placenta and milk fever in the dairy cow. *Ann Rech Vet* 22, 331-343.

Bauersachs, S., Mitko, K., Ulbrich, S.E., Blum, H., and Wolf, E. (2008). Transcriptome studies of bovine endometrium reveal molecular profiles characteristic for specific stages of estrous cycle and early pregnancy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 116, 371-384.

Bauersachs, S., Ulbrich, S.E., Gross, K., Schmidt, S.E., Meyer, H.H., Einspanier, R., Wenigerkind, H., Vermehren, M., Blum, H., Sinowatz, F., *et al.* (2005). Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes. *J Mol Endocrinol* 34, 889-908.

Bauersachs, S., Ulbrich, S.E., Gross, K., Schmidt, S.E., Meyer, H.H., Wenigerkind, H., Vermehren, M., Sinowatz, F., Blum, H., and Wolf, E. (2006). Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *Reproduction* 132, 319-331.

Bressou, C. (1978). *Anatomie régionale des animaux domestiques II - Les Ruminants*, 2ème édition edn (Paris, Éditions J.-B. Baillière).

Burdge, G.C., and Calder, P.C. (2005). Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev* 45, 581-597.

Burns, P.D., Engle, T.E., Harris, M.A., Enns, R.M., and Whittier, J.C. (2003). Effect of fish meal supplementation on plasma and endometrial fatty acid composition in nonlactating beef cows. *Journal of animal science* 81, 2840-2846.

Caldari-Torres, C., Rodriguez-Sallaberry, C., Greene, E.S., and Badinga, L. (2006). Differential effects of n-3 and n-6 fatty acids on prostaglandin F₂alpha production by bovine endometrial cells. *J Dairy Sci* 89, 971-977.

Celi, P., Merlo, M., Da Dalt, L., Stefani, A., Barbato, O., and Gabai, G. (2011). Relationship between late embryonic mortality and the increase in plasma advanced oxidised protein products (AOPP) in dairy cows. *Reproduction, Fertility and Development* 23, 527-533.

Chilliard, Y., Ferlay, A., and Doreau, M. (2000a). Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livestock Production Science* 70, 31-48.

Chilliard, Y., Ferlay, A., Mansbridge, R., M., and Doreau, M. (2000b). Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Ann Zootech* 49, 181-205.

Descoteaux, L., Gnemmi, G., and Colloton, J.D. (2009). *Guide pratique d'échographie pour la reproduction des ruminants* (Paris, MED'COM).

Dewhurst, R.J., Scollan, N.D., Lee, M.R.F., Ougham, H.J., and Humphreys, M.O. (2003). Forage breeding and management to increase the beneficial fatty acid content of ruminant products. *Proceedings of the Nutrition Society* 62, 329-336.

Din, J.N., Newby, D.E. and Flapan, A.D. (2004). Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease-fishing for a natural treatment. *British Medical Journal* 328, 30-35.

Doormaal, B.V. (2010). *Un regard sur la fertilité sous deux angles différents*, R.I. canadien, ed.

Emken, E.A., Adlof, R.O., Rakoff, H., Rohwedder, W.K., and Gulley, R.M. (1990). Metabolism in vivo of deuterium-labelled linolenic and linoleic acids in humans. *Biochemical Society transactions* 18, 766-769.

Fortier, M.A., Guilbault, L.A., and Grasso, F. (1988). Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 83, 239-248.

Friggens, N.C., Disenhaus, C., and Petit, H.V. (2010). Nutritional sub-fertility in the dairy cow: towards improved reproductive management through a better biological understanding. *Animal* 4, 1197-1213.

Fuller, M.F., Benevenga, N.J., Lall, S.P., McCracken, K.J., Omed, H.M., Axford, F., F.E., and Phillips, C.J.C. (2004). *The Encyclopedia of Farm Animal Nutrition*, M.F. Fuller, ed. (Wallingford, Oxon, CABI Publishing).

Gagnon, N., Cortes, C., da Silva, D., Kazama, R., Benchaar, C., Dos Santos, G., Zeoula, L., and Petit, H.V. (2009). Ruminal metabolism of flaxseed (*Linum usitatissimum*) lignans to the mammalian lignan enterolactone and its concentration in ruminal fluid, plasma, urine and milk of dairy cows. *Br J Nutr*, 1-9.

Goff, A.K. (2004). Steroid hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the estrous cycle. *Biol Reprod* 71, 11-16.

Grimaldi, P.A. (2001). Fatty acid regulation of gene expression. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 4, 433-437.

Ireland, J.J., Murphee, R.L., and Coulson, P.B. (1980). Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *J Dairy Sci* 63, 155-160.

Jump, D.B. (2002). The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *The Journal of biological chemistry* 277, 8755-8758.

Kabututu, Z., Manin, M., Pointud, J.C., Maruyama, T., Nagata, N., Lambert, S., Lefrancois-Martinez, A.M., Martinez, A., and Urade, Y. (2009). Prostaglandin F2alpha synthase activities of aldo-keto reductase 1B1, 1B3 and 1B7. *Journal of biochemistry* 145, 161-168.

Klein, C., Bauersachs, S., Ulbrich, S.E., Einspanier, R., Meyer, H.H., Schmidt, S.E., Reichenbach, H.D., Vermehren, M., Sinowatz, F., Blum, H., *et al.* (2006). Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the preattachment period. *Biol Reprod* 74, 253-264.

Lamming, G.E., Darwash, A.O., Wathes, D.C., and Ball, P.J. (1998). The fertility of dairy cattle in the UK: current status and future research. *Journal of the Royal Agricultural Society of England* 159, 82-93.

Lemaster, J.W., Seals, R.C., Hopkins, F.M., and Schrick, F.N. (1999). Effects of administration of oxytocin on embryonic survival in progestogen supplemented cattle. *Prostaglandins & other lipid mediators* 57, 259-268.

Lessard, M., Gagnon, N., and Petit, H.V. (2003). Immune response of postpartum dairy cows fed flaxseed. *J Dairy Sci* 86, 2647-2657.

Lucy, M.C. (2001). Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci* 84, 1277-1293.

Lucy, M.C. (2007). Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Society of Reproduction and Fertility supplement* 64, 237-254.

Madore, E., Harvey, N., Parent, J., Chapdelaine, P., Arosh, J.A., and Fortier, M.A. (2003). An aldose reductase with 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity is most likely the enzyme responsible for the production of prostaglandin f2 alpha in the bovine endometrium. *J Biol Chem* 278, 11205-11212.

Mann, G.E., Lamming, G.E., Robinson, R.S., and Wathes, D.C. (1999). The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *Journal of reproduction and fertility Supplement* 54, 317-328.

Mansouri-Attia, N., Aubert, J., Reinaud, P., Giraud-Delville, C., Taghouti, G., Galio, L., Everts, R.E., Degrelle, S., Richard, C., Hue, I., *et al.* (2009). Gene expression profiles of bovine caruncular and intercaruncular endometrium at implantation. *Physiological Genomics* 39, 14-27.

Massip, A., Mulnard, J., Vanderzwalm, P., Hanzen, C., and Ectors, F. (1982). The behaviour of cow blastocyst in vitro: cinematographic and morphometric analysis. *J Anat* 134, 399-405.

Mattos, R., Guzeloglu, A., Badinga, L., Staples, C.R., and Thatcher, W.W. (2003). Polyunsaturated fatty acids and bovine interferon-tau modify phorbol ester-induced secretion of prostaglandin F2 alpha and expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and phospholipase-A2 in bovine endometrial cells. *Biol Reprod* 69, 780-787.

Mattos, R., Staples, C.R., Arteché, A., Wiltbank, M.C., Diaz, F.J., Jenkins, T.C., and Thatcher, W.W. (2004). The effects of feeding fish oil on uterine secretion of PGF2alpha, milk composition, and metabolic status of periparturient Holstein cows. *J Dairy Sci* 87, 921-932.

Mattos, R., Staples, C.R., and Thatcher, W.W. (2000). Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Rev Reprod* 5, 38-45.

Meier, S., Ledger, A.M., Sato, T.A., Peterson, A.J., and Mitchell, M.D. (2009). Polyunsaturated fatty acids differentially alter PGF(2alpha) and PGE(2) release from bovine trophoblast and endometrial tissues during short-term culture. *Anim Reprod Sci* 111, 353-360.

Mitko, K., Ulbrich, S.E., Wenigerkind, H., Sinowatz, F., Blum, H., Wolf, E., and Bauersachs, S. (2008). Dynamic changes in messenger RNA profiles of bovine endometrium during the oestrous cycle. *Reproduction* 135, 225-240.

Olson, S.E., and Seidel, G.E., Jr. (2000). Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biol Reprod* 62, 248-252.

Palin, M.F., Beaudry, D., Vallée, M., Bissonnette, N., Murphy, B.D. and Petit, H.V. (2009) Development of a two-species cDNA microarray for transcriptional profiling of sow and dairy cow reproductive traits. ADSA-CSAS-ASAS Joint Conference, Montreal, Quebec. *J. Anim. Sci.* 87, E-Suppl.2/J. Dairy Sci. 92, 399, E-Suppl. 1 (Abstract W47).

Palin, M.F., Brochu-Gaudreau, K., Small, J.A., Beaudry, D., and Petit, H.V. (2006). Use of subtractive hybridization to identify genes affected by omega 3 fatty acids in day 17 embryos and endometrial tissues. In Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 13-18 August, 2006 (Minas Gerais, Instituto Prociencia), pp. 11-12.

Parent, J., Chapdelaine, P., Sirois, J., and Fortier, M.A. (2002). Expression of microsomal prostaglandin E synthase in bovine endometrium: Coexpression with cyclooxygenase type 2 and regulation by interferon- τ . *Endocrinology* 143, 2936-2943.

Parent, J., and Fortier, M.A. (2005). Expression and contribution of three different isoforms of prostaglandin E synthase in the bovine endometrium. *Biol Reprod* 73, 36-44.

Parent, J., Villeneuve, C., and Fortier, M.A. (2003). Evaluation of the contribution of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 to the production of PGE2 and PGF2 alpha in epithelial cells from bovine endometrium. *Reproduction* 126, 539-547.

Peters, A.R., and Ball, P.J.H. (1987). *Reproduction in Cattle* (London, Butterworths).

Petit, H.V. (2003). Digestion, milk production, milk composition, and blood composition of dairy cows fed formaldehyde treated flaxseed or sunflower seed. *J Dairy Sci* 86, 2637-2646.

Petit, H.V. (2010). Review: Feed intake, milk production and milk composition of dairy cows fed flaxseed. *Canadian Journal of Animal Science* 90, 115-127.

Petit, H.V., Dewhurst, R.J., Proulx, J.G., Khalid, M., Haresign, W., and Twagiramungu, H. (2001). Milk production, milk composition, and reproductive function of dairy cows fed different fats. *Canadian Journal of Animal Science* 81, 263-271.

Petit, H.V., Dewhurst, R.J., Scollan, N.D., Proulx, J.G., Khalid, M., Haresign, W., Twagiramungu, H., and Mann, G.E. (2002). Milk production and composition, ovarian function, and prostaglandin secretion of dairy cows fed omega-3 fats. *J Dairy Sci* 85, 889-899.

Petit, H.V., and Gagnon, N. (2009). Concentration of the mammalian lignans enterolactone and enterodiols in milk of cows fed diets containing different concentrations of whole flaxseed. *Animal* 3, 1428-1435.

Petit, H.V., Gagnon, N., and Palin, M.F. (2009). Influence of Fatty Acids on Reproduction and Immune Function in Ruminants. Paper presented at: Proceedings of the 30th Western Nutrition Conference; Optimizing Efficiency of Animal Production (Winnipeg, Manitoba, Canada).

Petit, H.V., Germiquet, C., and Lebel, D. (2004). Effect of feeding whole, unprocessed sunflower seeds and flaxseed on milk production, milk composition, and prostaglandin secretion in dairy cows. *J Dairy Sci* 87, 3889-3898.

Petit, H.V., Small, J.A., Palin, M.F., Giguère, A., and Santos, G.T.D. (2007). Effects of flaxseed supplementation on endometrial expression of ISG17 and intrauterine prostaglandin concentrations in primiparous dairy cows submitted to GnRH-based synchronized ovulation. *Canadian Journal of Animal Science* 87, 343-352.

Petit, H.V., and Twagiramungu, H. (2006). Conception rate and reproductive function of dairy cows fed different fat sources. *Theriogenology* 66, 1316-1324.

Prasad, K. (2000). Antioxidant activity of secoisolariciresinol diglucoside-derived metabolites, secoisolariciresinol, enterodiols, and enterolactone. *International Journal of Angiology* 9, 220-225.

Pratt, B.R., Butcher, R.L., and Inskeep, E.K. (1977). Antiluteolytic effect of the conceptus and of PGE₂ in ewes. *Journal of animal science* 45, 784-791.

Pru, J.K., Austin, K.J., Haas, A.L., and Hansen, T.R. (2001). Pregnancy and interferon- τ upregulate gene expression of members of the 1-8 family in the bovine uterus. *Biol Reprod* 65, 1471-1480.

Ringbom, T., Huss, U., Stenholm, A., Flock, S., Skattebol, L., Perera, P., and Bohlin, L. (2001). Cox-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids. *Journal of natural products* 64, 745-749.

Robinson, R.S., Pushpakumara, P.G., Cheng, Z., Peters, A.R., Abayasekara, D.R., and Wathes, D.C. (2002). Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. *Reproduction* 124, 119-131.

Salisbury, G.W., VanDemark, N.L., and Lodge, J.R. (1978). *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*, 2 edn (San Francisco, W. H. Freeman).

Schmitt, R.A., Geisert, R.D., Zavy, M.T., Short, E.C., and Blair, R.M. (1993). Uterine cellular changes in 2',5'-oligoadenylate synthetase during the bovine estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* 48, 460-466.

Schmitz, G., and Ecker, J. (2008). The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research* 47, 147-155.

Scislowski, V., Bauchart, D., Gruffat, D., Laplaud, P.M., and Durand, D. (2005). Effects of dietary n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids protected or not against ruminal hydrogenation on plasma lipids and their susceptibility to peroxidation in fattening steers. *Journal of animal science* 83, 2162-2174.

Seals, R.C., Lemaster, J.W., Hopkins, F.M., and Schrick, F.N. (1998). Effects of elevated concentrations of prostaglandin F2 alpha on pregnancy rates in progestogen supplemented cattle. *Prostaglandins & other lipid mediators* 56, 377-389.

Smith, W.L., and Dewitt, D.L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Advances in immunology* 62, 167-215.

Spencer, T.E., Johnson, G.A., Bazer, F.W., Burghardt, R.C., and Palmarini, M. (2007). Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction, fertility, and development* 19, 65-78.

Tai, H.H., Ensor, C.M., Tong, M., Zhou, H., and Yan, F. (2002). Prostaglandin catabolizing enzymes. *Prostaglandins & other lipid mediators* 68-69, 483-493.

Thatcher, W.W., Guzeloglu, A., Mattos, R., Binelli, M., Hansen, T.R., and Pru, J.K. (2001). Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology* 56, 1435-1450.

Thatcher, W.W., Staples, C.R., Danet-Desnoyers, G., Oldick, B., and Schmitt, E.P. (1994). Embryo Health and Mortality in Sheep and Cattle. *Journal of animal science* 72, 16-30.

Thompson, L.U., and Cunnane, S.C. (2003). *Flaxseed in Human Nutrition*, 2nd edn (Champaign, Illinois, AOCS Press).

Wang, B., and Goff, A.K. (2003). Interferon-tau stimulates secretion of macrophage migration inhibitory factor from bovine endometrial epithelial cells. *Biol Reprod* 69, 1690-1696.

Wathes, D.C., Abayasekara, D.R., and Aitken, R.J. (2007). Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod* 77, 190-201.

Xiao, C.W., and Goff, A.K. (1998). Differential effects of oestradiol and progesterone on proliferation and morphology of cultured bovine uterine epithelial and stromal cells. *J Reprod Fertil* 112, 315-324.

Xiao, C.W., Murphy, B.D., Sirois, J., and Goff, A.K. (1999). Down-regulation of oxytocin-induced cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase expression by interferon-tau in bovine endometrial cells. *Biol Reprod* 60, 656-663.

Zakrzewska, E., Madore, E., Chapdelaine, P., and Fortier, M.A. (2005). Downregulation of AKR1B1 and MPGES1 by RNA silencing reduces prostaglandin production in human endometrial cells. In Annual Meeting, Society for the Study of Reproduction (Biology of Reproduction), pp. (Special Issue): M760 (Abstract).